

Synthese und Einfluss von fluorierten Indolen-, 7-*N*-Purin und 9-*N*-Deazapurin-Nukleosiden auf die RNA Stabilität



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Jelena Božilović
aus
Niš, Serbien

Frankfurt am Main
März 2008
(D F 1)

Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menscheng Geist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht.

Max Planck

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. W. Engels in der Zeit von Januar 2004 bis November 2007 angefertigt.

Herrn **Prof. Dr. J. W. Engels** danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung, die sehr guten experimentellen Bedingungen und die gewährte akademische Freiheit. Durch seine Kenntnisse und Erfahrungen sowie die stetige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen hat er Einfluß auf diese Arbeit genommen.

Weiterhin danke ich allen, die direkt oder indirekt zur Durchführung dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich:

- Meinen Kollegen Dr. Aleksandra Živković, Dalibor Odadzić, Nadja Nikolaus, Dr. Astrid Klöpffer, Alma Sokočević Gerda Wittel, Jens Haas usw. für die sehr gute Zusammenarbeit und die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.
- Dr. Aleksandra Živković für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, ihre vielen praktischen Tips und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.
- Dalibor Odadzić und Nadja Nikolaus für Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und für die kritische Durchsicht des Manuskripts.
- Dr. Zimmermann, seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Messung zahlreicher NMR-Spektren.
- Dr. Jan W. Bats für die Durchführung der Röntgenstrukturanalysen und Auswertung der kristallographischen Daten.
- Dr. G. Dürner und seinen Mitarbeiterinnen für die präparativen HPLC-Trennungen der TBDMS-geschützten Nukleoside.
- Hannelore Brill und Ilona Priess für die Messung der Massenspektren.

- Marianne Christof für die Durchführung der Elementaranalysen.
- Gerda Wittel für die Bestellung von Literatur.
- Alle nicht namentlich genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt ferner:

- Dem SFB für die finanzielle Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung in Nukleinsäure Chemie	1
1.1	Grundlagen der Nukleinsäurechemie	2
1.2	Aufbau von Nukleinsäuren	4
1.3	RNA-Strukturen	8
1.4	Duplex stabilisierende Wechselwirkungen	9
1.4.1	Wasserstoffbrücken	9
1.4.2	Basenstapelungswechselwirkungen	10
1.4.3	Solvatation und Salzeffekte	11
1.5	Therapeutische Oligonukleotide	13
1.5.1	Regulation der Genexpression	14
1.6	Universelle Basen	17
2	Einfluss von Fluor auf Nukleinsäuren	19
2.1	Fluormodifikationen am Zucker	20
2.1.1	C2'-Fluornukleoside	20
2.1.2	C3'-Fluornukleoside	22
2.1.3	C4'-Fluornukleoside	22
2.1.4	C5'-Fluornukleoside	23
2.2	Fluormodifikationen an der Phosphatgruppe	23
2.3	Fluormodifikationen an der Nukleobase	25
2.3.1	Fluormodifizierte Pyrimidine	25
2.3.2	Fluormodifizierte Purine	26
2.4	Fluormodifikationen an RNA-Oligonukleotiden	27
3	Aufgabenstellung	29
4	Chemische Synthesen	31
4.1	Darstellung ausgewählter artifizieller Basen	33
4.1.1	Darstellung der Fluorindole	33
4.1.2	Darstellung von 9-N-Deazapurin	34
4.2	Glycosylierung Reaktionen	35
4.2.1	Darstellung von 3,5-Di-O-p-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranosylchlorid	37
4.3	Synthese der RNA-Bausteine	44
4.3.1	Dimethoxytritylierung der 5' OH-Funktion	44
4.3.2	Die TBDMS-Schutzgruppe	45
4.3.3	Phosphitylierung	46
4.4	Syntheseübersicht	49
4.5	Abasischer Baustein	53
5	Kristallstrukturanalysen	55
5.1	Bragg-Gleichung	55
5.2	Kristallstrukturanalysen der Nukleosidanaloga	57
6	Oligonukleotide	62
6.1	Synthese von Oligonukleotiden	62
6.2	Die Phosphoramidit-Methode	62
6.3	Synthetisierte Oligonukleotide	65
6.4	Aufreinigung von Oligonukleotiden	66
6.5	Charakterisierung von Oligonukleotiden	70

6.6	Verteilungskoeffizienten	72
7	Spektroskopische Untersuchungen der Oligonukleotide	73
7.1	UV-spektroskopische Untersuchungen	73
7.2	Auswertung der UV-Schmelzkurven.....	76
7.2.1	Bestimmung des Schmelzpunktes	76
7.2.2	Bestimmung der thermodynamischen Daten	79
7.3	Ergebnisse der UV-Schmelzkurven.....	81
7.3.1	Fluorierte Indole	84
7.3.2	4,6-Difluorbenzimidazol-, 4,6-Difluorindol-, 7- <i>N</i> -Purin und 9-Deazapurin-Nukleoside.....	89
7.4	Enthalpie – Entropie Kompensation	94
7.5	CD-spektroskopische Untersuchungen	97
8	PMF Berechnungen.....	100
8.1	Methoden	100
8.2	Ergebnisse und Diskussion	102
8.3	Vorhersage.....	104
8.4	Schlussfolgerung.....	106
9	Zusammenfassung & Ausblick	107
10	Experimenteller Teil.....	113
10.1	Allgemeines.....	113
10.1.1	Chromatographie	113
10.1.2	Spektroskopie	115
10.1.3	Massenspektrometrie	115
10.1.4	Elementaranalyse	116
10.1.5	Verwendete Chemikalien	116
10.1.6	Eingesetzte Pufferlösungen	120
10.2	Liste der synthetisierten Verbindungen	122
10.3	Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen	129
10.4	Synthesen und Aufreinigung der Oligonukleotides.....	242
10.4.1	Eingesetzte Lösungen.....	242
10.4.2	Synthese der Oligonukleotiden	243
10.5	Aufreinigung und Analytik der Oligonukleotide	243
10.5.1	Aufreinigung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie	243
10.5.2	Quantifizierung der Menge an Oligonukleotid	244
10.5.3	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden	244
10.6	Aufnahme der UV-Schmelzkurven	246
10.7	CD-Spektroskopie der Oligonukleotide	247
10.8	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten	248
11	Literaturverzeichnis	249
12	Anhang.....	259
Teil A	Kristallstrukturen	260
A1	Fluorierte Indolribonukleoside.....	260
A2	1'-Desoxy-1'-(7- <i>N</i> -purin)- β -D-ribofuranose	260
Teil B	Ausgewählte Spektren	268
B1	¹ H-NMR Spektrum von 3-Amino-2-ethoxycarbonylpyrrol 30.....	269
B2	¹ H-NMR Spektrum von 3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> -Pyrrolo[2,3- <i>d</i>]pyrimidin-4-on 31	270
B3	¹ H-NMR Spektrum von 6-Chloro-9-deaza-purin 32	271

B4	¹ H-NMR Spektrum von 1-(2'-desoxy-β-D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-7-fluorindol	
38		272
B5	¹ HMBC-NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(7- <i>N</i> -purin)-β-D-ribofuranose	48
		273
B6	¹ H-NMR Spektrum von 4,6-Difluorindol-2-carbonsäure	109 274
B7	COSY-NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose	49
		275
B8	¹ H-NMR Spektrum von 1-(2'-desoxy-β-D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-4,6-	
	difluorindol	38 276
Teil C	Abkürzungsverzeichnis	277

1 Einführung in Nukleinsäure Chemie

Die Nukleinsäuren sind die zentralen Moleküle des Lebens. Sie spielen in allen Bereichen der lebendigen Welt eine nicht zu unterschätzende Rolle. Man muss bei Nukleinsäuren zwischen der 2'-Desoxyribonukleinsäure (DNA) und der Ribonukleinsäure (RNA) unterscheiden. Während die DNA der Träger der genetischen Information in fast allen Bereichen der Tier- und Pflanzenwelt ist, ist die RNA hauptsächlich für die Umsetzung der Information der DNA in Proteine verantwortlich. Das Finden der DNA-Doppelhelix-Struktur durch James D. Watson und H. C. Crick ist ein Meilenstein für die Entwicklungen in der Molekularbiologie und der Nukleinsäurechemie der letzten Jahrzehnte. So wurde das tiefgreifende Verständnis molekularer Vorgänge wie z.B. der Replikation, der Evolution und der Diversität von Spezies ermöglicht. Schließlich führten diese Entwicklungen zu einem der größten Projekte der Menschheit: zur Sequenzierung des 3,3 Milliarden Basen umfassenden humanen Genoms im Rahmen des HUGO-Projektes ("Human Genome Project", Venter et al., 2001; Lander et al., 2001). Die Weiterentwicklung medizinischer Anwendungen wie z.B. der Gentherapie, Fortschritte bei molekularbiologischen Technologien wie z.B. das Klonen und nicht zuletzt die Entdeckung der RNA-Interferenz, welche das gezielte Ausschalten beliebiger Gene ermöglicht, sind weitere eindrucksvolle Beispiele der modernen "Life Sciences".

Die Ausweitung der Forschung von DNA - dem Träger der genetischen Information - auf die Ribonukleinsäure (RNA) führte dazu, dass der RNA heute eine zentrale Rolle in der Molekularbiologie der Zelle zugeschrieben wird. Zuvor wurde RNA lediglich eine

Vermittlerrolle zwischen DNA und Protein zugesprochen ("Vom Boten zum Boss"; V. Bredow, 2003). Aufgrund neuer Erkenntnisse über die Mechanismen, Strukturen und Funktionen von RNA entwickelte sich das Gebiet der funktionellen Genetik ("Functional Genomics"). Dies eröffnet die Möglichkeit mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden die Genexpression zu regulieren und zu studieren. Nicht zuletzt aufgrund der Weiterentwicklung des Konzeptes der RNA-Interferenz zur therapeutischen Anwendung wurde die RNA im Jahre 2002 vom Science-Magazin zum "Molekül des Jahres" gekürt ("Breakthrough of the Year"; Couzin, 2002); eine Auszeichnung, welche die wichtige und zentrale Rolle der RNA-Chemie in diesem Jahrzehnt verdeutlicht. Die Bedeutung der RNA spiegelt sich am besten mit den zwei Nobelpreisen im Jahr 2006 für die Entdeckungen im Bereich der RNA. Der Preis in Chemie bekam, als alleiniger Preisträger Roger Kornberg für seine Forshung das Enzym RNA-Polymerase und Aufklärung, dass es die Synthese von RNA katalysiert. Für die Entdeckung der RNA-Interferenz, dem Stilllegen von Genen durch doppelsträngige RNA wurde der Nobelpreis an Craig Mello und Andrew Fire für Medizin oder Physiologie verliehen.

1.1 Grundlagen der Nukleinsäurechemie

Die 2'-Desoxyribonukleinsäure (DNA) wurde schon früh als Träger der genetischen Information identifiziert (Avery, 1944). Zu Beginn der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts begann man verstärkt mit der Strukturanalyse dieses Biopolymers. Die Feststellung Erwin Chargaffs, dass sich die Mengen an Adenin und Thymin sowie die Mengen an Guanin und Cytosin in DNA-Strängen jeweils entsprechen (Chargaff, 1951a&b), lieferte erste Hinweise darauf, dass DNA-Moleküle als Dimere vorliegen. Alexander Todd identifizierte die internukleosidischen Bindungen als 3'-5'-Phosphordiester-Brücken (Brown & Todd, 1952). Die von M. Wilkins und Rosalind Franklin durchgeführten Röntgenbeugungs-Untersuchungen an DNA-Fasern ließen eindeutig auf eine Helixstruktur schließen. Diese sollte aus zwei antiparallel ausgerichteten DNA-Strängen bestehen (Wilkins, 1952; Wilkins 1953a&b; Franklin, 1953). Zuvor war es R. Franklin bereits gelungen zwischen kristalliner A- und B-Form der DNA zu unterscheiden (Olby, 2003).

Unter Berücksichtigung von Chargaffs Regel und den Erkenntnissen von Todd, Wilkins und Franklin postulierten James Watson und der erst kürzlich verstorbene Francis Crick im Jahre 1953 die korrekte Doppelhelix-Struktur der DNA (Watson & Crick, 1953a&b). Sie widerlegten damit Raummodelle aus drei umeinander geschlungenen Strängen, die zuvor von Pauling und Corey vorgeschlagen wurden (Pauling & Corey, 1953a&b). Die postulierte Doppelhelix nach Watson & Crick besteht aus zwei zueinander komplementären, antiparallelen DNA-Strängen, die sich rechtsgängig um eine gemeinsame Achse winden (Abbildung 1.1a). Die 2'-Desoxyribose und das polyanionische Phosphordiester-Rückgrat zeigen dabei nach außen, während die Nukleobasen zueinander in die Helixmitte gerichtet sind. Dabei stehen sich immer Adenin und Thymin gegenüber und bilden durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen ein Basenpaar. Das zweite sogenannte "Watson-Crick-Basenpaar" bilden Guanin und Cytosin durch die Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken (Abbildung 1.1b). Ein G-C-Basenpaar trägt somit mehr zur Stabilität einer Doppelhelix bei als ein A-T-Basenpaar.

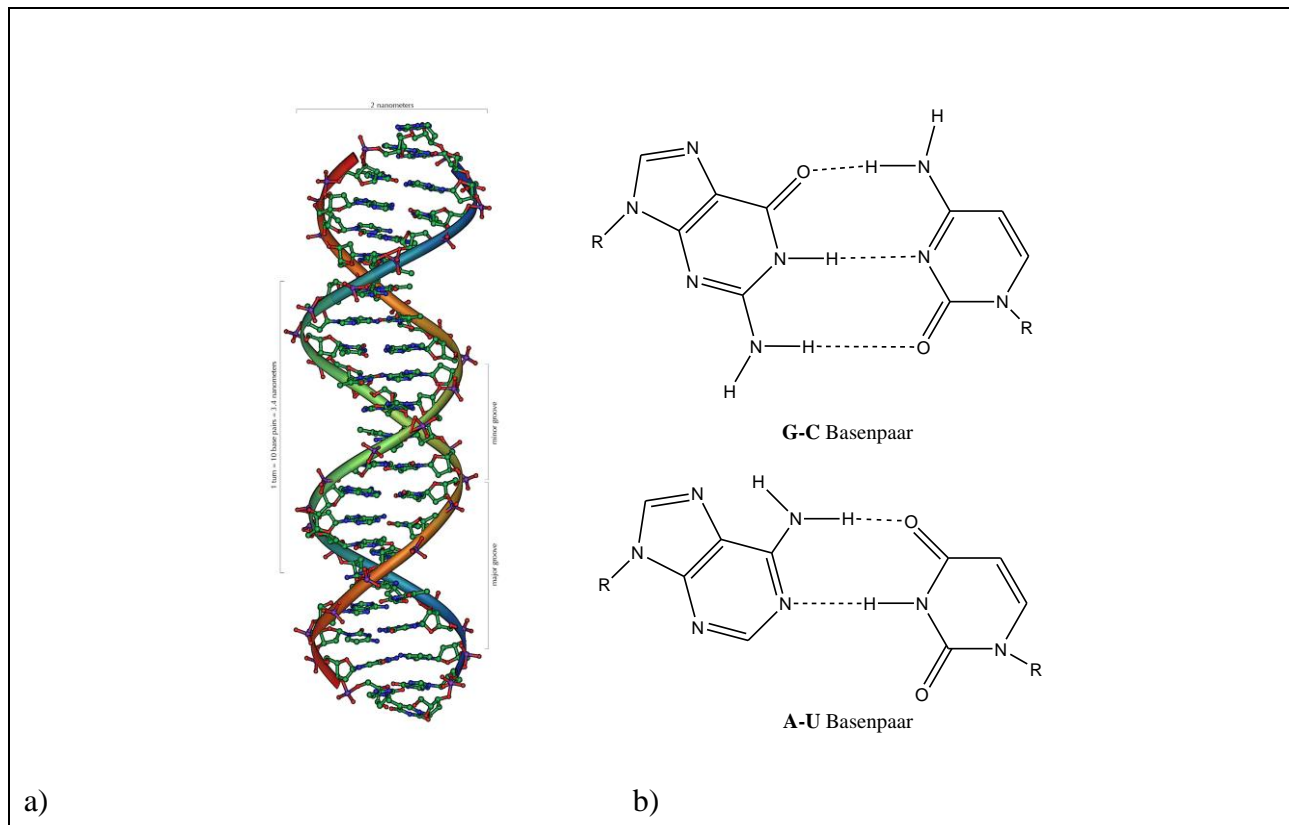


Abbildung 1.1:

a) schematische Darstellung der DNA-Doppelhelix; b) die Watson-Crick-Basenpaare R=Ribose (RNA), 2'-Desoxyribose (DNA). In der DNA ist Uracil durch Thymin (5-Methyluracil) ersetzt

Grundvoraussetzung dafür ist, dass die Nukleobasen in der Amino-Keto-Tautomerform vorliegen, damit die Donor-Akzeptormuster kompatibel sind. Die Nukleobasen stehen dabei senkrecht zur Ebene des Furanoserings. Unter Einbeziehung allgemeiner chemischer (Struktur-) Daten gaben Watson & Crick als Helixradius, d.h. als Abstand zwischen dem Phosphoratom und der Helixachse, 10 Å an (Watson & Crick, 1953a).

Die Möglichkeit, dass auch Ribonukleinsäuren helicale Strukturen ausbilden könnten, wurde von Watson und Crick ausgeschlossen (Watson & Crick, 1953a). Sie vermuteten, dass die Ribose mit der – im Vergleich zur DNA zusätzlichen 2'-Hydroxygruppe – sterisch zu anspruchsvoll sei.

Bereits in diesem "legendären" Nature-Artikel wird erwähnt, dass die sequenzspezifische Hybridisierung von DNA-Strängen einen Kopiermechanismus für die genetische Information darstellen könnte. Die Untersuchungen zum Fluss der genetischen Information vom Gen zum Protein wurden erstmals 1958 von F. Crick veröffentlicht (Crick, 1958).

Später wurde dieses grundlegende Prinzip als "zentrales Dogma der Molekularbiologie" bekannt. Die beschriebenen wegweisenden Arbeiten auf dem Gebiet der DNA-Strukturanalyse wurden 1962 mit dem Nobelpreis für Medizin an James Watson, Francis Crick und Maurice Wilkins honoriert.

1.2 Aufbau von Nukleinsäuren

Doppelhelix-Konformationen können in drei unterschiedliche Formen ausgebildet werden: A-, B- und Z-Form. Konformationstypen A- und B-Form bilden die rechtsgängige Helix aus, während die Z-Form linksgängig (Saenger, 1984).

Die DNA-Doppelhelix bildet meistens eine B-Form mit einer breiten „großen Furche“ („major groove) und einer engen und tiefen „kleinen Furche“ aus. Sie wird durch Hydratation stabilisiert. In den Furchen wird eine hochgeordnete Anlagerung von Wassermolekülen beobachtet. Die Konformationsänderungen sind möglich und reversibel. Die A-Form-Helix kann durch Dehydratisierung entstehen. A-Form-Helix ist bevorzugt von RNA-RNA-Doppelsträngen ausgebildet. RNA/DNA-Hybride, wie sie in Promoter/Templat-Regionen als Erkennungssequenz für bestimmte Enzyme (z.B. Reverse Transkriptase) vorkommen, liegen ebenfalls in der A-Form vor. Diese wird durch den breiten Helixdurchmesser von 2,6 nm und der starken Neigung ihrer Nukleobasen zur Helixachse charakterisiert (Stryer, 1991).

	A-Form	B-Form	Z-Form
helicaler Drehsinn	rechtsgängig	rechtsgängig	linksgängig
Helixdurchmesser	2,6 nm	2 nm	1,8 nm
Basenpaare pro helicaler Windung	11	10	12
Helicaler Anstieg pro Basenpaar	0,26 nm	0,34 nm	0,37 nm
Konformation der glycosid. Bindung	anti	anti	anti (Pyrimidine); syn (Purine)
Ganghöhe (Anstieg/Windung)	2,8 nm	3,4 nm	4,5 nm
Basenneigung zur Helixachse	20°	6°	7°
große Furche	eng, tief	breit, tief	flach
kleine Furche	breit, flach	eng, tief	eng, tief
Ribose-Konformation	C3'-endo	C2'-endo	C2'-endo (Pyrimidine) C3'-endo (Purine)

Tabelle 1: Strukturelle Eigenschaften von idealen A-, B- und Z-Form-Helix (Voet, 1994)

Im Gegensatz zu A- und B-DNA ist die Z-DNA linksgängig. Die schlanke Helixform (Z-Form) bewirkt eine erhöhte elektrostatische Abstoßung der Polynukleotidstränge, welche durch hohe Salzkonzentration reduziert wird (Wang, 1979; Gessner, 1989). Zum besseren Vergleich der Unterschiede der einzelnen DNA-Typen sind die charakteristischen Daten von A-, B- und Z-DNA nochmals in Tabelle 1 zusammengefasst.

Die heterocyclischen Nukleobasen der natürlichen Nukleotide weisen ein planares Purin-Grundgerüst (bei A und G) bzw. ein Pyrimidin-Grundgerüst (bei C und T/U) auf. Diese sind jeweils β -N-glycosidisch mit dem C1'-Kohlenstoff des Zuckers verknüpft (Abbildung 1.2).

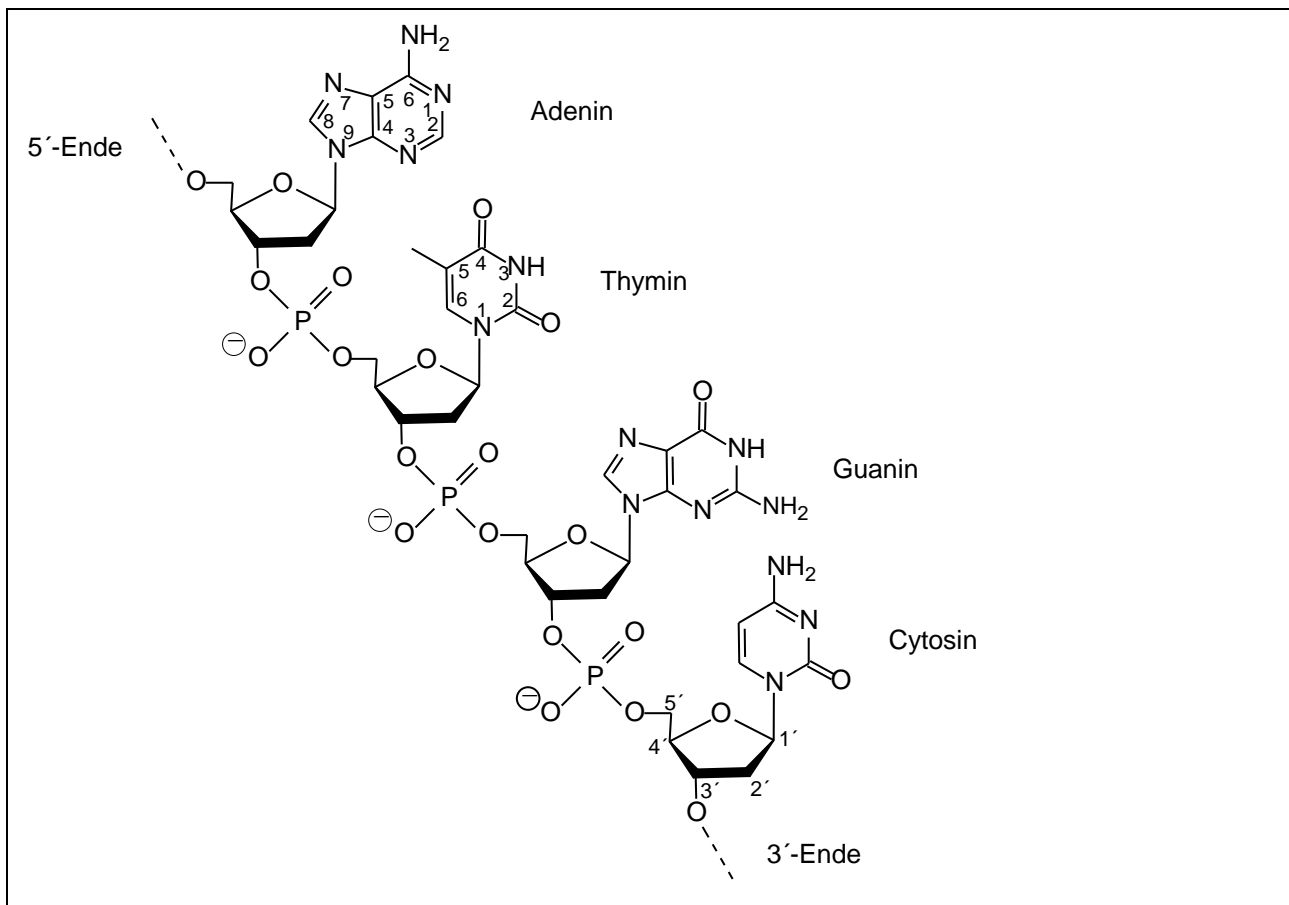


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau einer DNA mit Nummerierung der Nukleobasen

Zeigt die Watson-Crick Bindungsseite der Nukleobase von der Ribose weg, so spricht man von einer anti-Konformation der glycosidischen Bindung. Diese wird aufgrund von sterischen Effekten bevorzugt eingenommen. In der syn-Konformation ist der Hauptteil der Nukleobase dem Zucker zugewandt. Die Ebene der Nukleobasen steht dabei nahezu senkrecht zur Ebene der (2'-Desoxy-) Ribose. Die nukleosidische Zuckerkonformation ("sugar puckering") unterscheidet sich je nach Helixform. Der nicht planere Ribofuranosering kann dabei zwei verschiedene Hauptkonformationen einnehmen: die E- ("envelope") und die T-Konformation ("twist"). Bei der E-Konformation liegen vier Atome des Furanoserings in einer Ebene und das fünfte Atom steht um ca. 0,5 Å nach oben oder unten aus der Ebene heraus. Steht das Atom in Richtung C5' und Nukleobase aus der Ebene, spricht man von einer endo-Konformation; die gegensätzliche Orientierung wird mit exo bezeichnet. In Doppelhelices liegen die Zucker in einer C2'-endo (DNA) und C3'-endo (RNA)-Konformation vor. Die twist-Konformation entsteht, wenn nur drei Atome des Furanoserings in einer Ebene liegen und je eines der anderen Atome über bzw. unter der Ebene liegt (Abbildung 1.3).

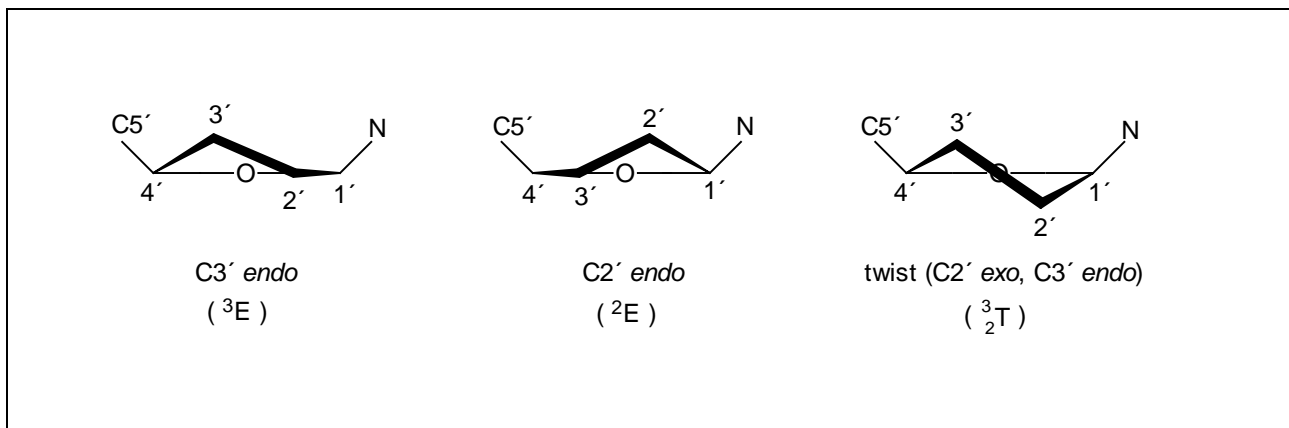


Abbildung 1.3: Drei mögliche Konformationen des Furanoserings

Statt des fünfgliedrigen Furanoseringes können in synthetischen DNA-Strängen auch Hexopyranose-Analoga eingebaut werden. Untersuchungen haben gezeigt (Hendrix, 1997), dass solche Nukleinsäuren oft keine helicalen Strukturen mehr ausbilden, sondern flache, "Leiter artige" Strukturen. Zudem ist in vielen Fällen die Bindung solcher Oligonukleotide an RNA verstärkt, so dass sie gute mRNA-Inhibitoren darstellen (van Aerschot, 2003).

1.3 RNA-Strukturen

Im Hinblick auf die große Diversität der auf speziellen dreidimensionalen RNA Strukturen basierenden biologischen Funktionen muss RNA eine große Variationsbreite von Sekundär- und Tertiärstrukturen ausbilden können. Sie können neben helicalen, doppelsträngigen Bereichen auch komplexe, globuläre Strukturen ausbilden, deren Untereinheiten durch Einzelstrangsegmente verbunden sind (Abbildung 4). Die Unterschiede der ausgebildeten Konformationen und der chemischen Reaktivität der Ribonukleinsäure im Vergleich zur DNA liegt in der Präsenz der 2'-Hydroxygruppe. Computer gestützte Strukturaussagen sind bei komplexen Systemen wie der ribosomalen RNA und viralen RNA-Komplexen sehr hilfreich (z. B. <http://rna.chem.rochester.edu>). In Zellen vorkommende RNA ist in fünf Klassen eingeteilt: die Boten-RNA ("messenger RNA"; mRNA), die Transfer-RNA (tRNA), die ribosomale RNA (rRNA), Ribozym (katalytische RNA) und regulierende RNAs (Riboswitches, siRNA, microRNA).

Eine RNA Doppelhelix hat immer die Form einer A-DNA. Ein Übergang in die B-Form ist aus sterischen Gründen nicht möglich. Einem Übergang steht die 2'-Hydroxylgruppe im Wege. Spezifische RNA-Sekundär-struktur-Elemente werden bei nicht oder nur teilweise komplementären Regionen beobachtet (Holbrook, 1998; Puglisi, 1998). Es existieren einfache Motive wie die Haarnadelschleife ("hairpin loop") und interne Schleifen ungepaarter Nukleotide ("loops"). Ein- und beidseitige Ausstülpungen ("bulges") werden von ungepaarten Strangabschnitten in einer Helix ausgebildet. Zudem sind oft komplexe Systeme wie z.B. Kreuzungen ("junctions") zu beobachten. Diese sind häufig in biologischen RNA-Strukturen anzutreffen. Ungepaarte RNA-Regionen dienen oft als biologische Erkennungsmuster oder stabilisierende Elemente. Dabei spielt die Tertiärstruktur der RNA eine wichtige Rolle. Oft wird die korrekte dreidimensionale Konformation erst durch die Anlagerung eines Proteins, eines Mg^{2+} -Ions o.ä. induziert. Die korrekte Tertiärstruktur einer RNA ermöglicht in vielen Fällen überhaupt erst deren biologische Aktivität.

1.4 Duplex stabilisierende Wechselwirkungen

1.4.1 Wasserstoffbrücken

Das Donoratom in einer Wasserstoffbrücke ist in biologischen Systemen ein Sauerstoff- oder ein Stickstoffatom mit kovalent gebundenem Wasserstoff. Als Akzeptor tritt ebenfalls ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom auf. Wasserstoffbrücken sind stärker als van-der-Waals-Bindungen, aber viel schwächer als kovalente Bindungen. Entsprechend ist auch die Länge einer Wasserstoffbrücke zwischen der einer van-der-Waals- und der einer kovalenten Bindung. Eine wichtige Eigenschaft von Wasserstoffbrücken ist ihre Richtungscharakteristik. Die stärkste Bindung liegt vor, wenn Donor-, Akzeptor- und Wasserstoffatom in einer Linie liegen. Je weiter diese die Ideallinie verlassen und der Bindungswinkel aufgeweitet wird, desto schwächer wird die entsprechende Wasserstoffbindung (Stryer, 1991).

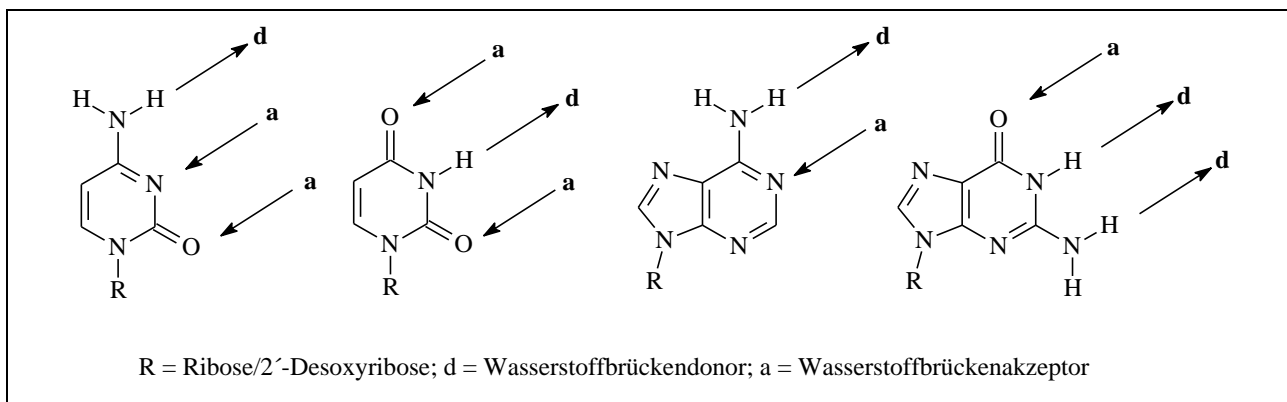


Abbildung 1.4: Wasserstoffbrückendonor und -akzeptor Verteilungsmuster in natürlich vorkommenden Nukleosiden

Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von Oligonukleotiden weisen eine Stärke von ca. 6-10 kJ/mol auf. Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor einer Wasserstoffbrücke liegt zwischen 2,8 und 2,95 Å. Das Donor und Akzeptor Verteilungsmuster (Abbildung 4)

der einzelnen Nukleobasen ist entscheidend für die Bildung der Watson-Crick Basenpaare.

Neben Watson-Crick Basenpaaren gibt es noch Hoogsteen Basenpaare (Hoogsteen, 1959). Bei ihnen bilden sich die Wasserstoffbrücken zwischen der Watson-Crick Seite eines Pyrimidins und der Watson-Crick abgewandten Seite (Hoogsteen Seite) eines Purins. Sie spielen in einer Doppelhelix allerdings keine Rolle. Im Gegensatz dazu tritt die sogenannte Wobble-Basenpaarung bei RNA vereinzelt auf. Dabei werden die bindenden Nukleobasen leicht gegeneinander verschoben, so dass die Donor-Akzeptorverteilung für die Bildung von Wasserstoffbrücken wieder passt. Beispiele hierfür sind das Uridin-Guanosin und das Uridin-Inosin Wobble-Paar (Abbildung 1.5).

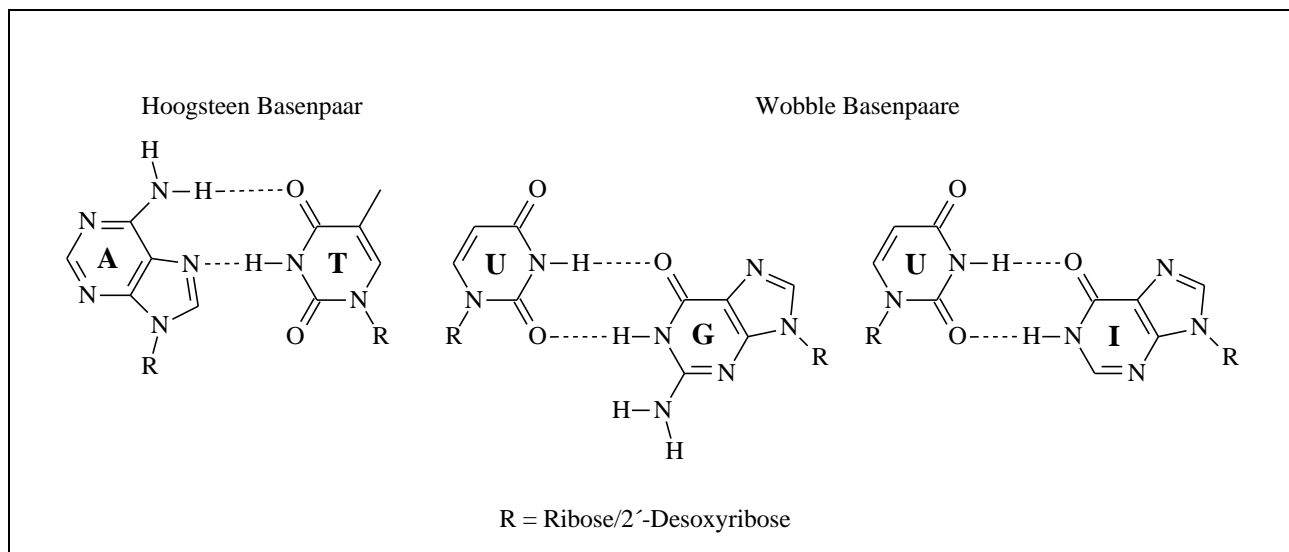


Abbildung 1.5: Hoogsteen und Wobble Basenpaare

1.4.2 Basenstapelungswechselwirkungen

Neben den Wasserstoffbrücken in den Basenpaaren werden Doppelhelices auch durch π - π -Basenstapelungs-Wechselwirkungen stabilisiert (" π - π - base stacking"). Diese entstehen zwischen benachbarten Nukleobasen eines Oligonukleotidstranges. Die Stärke der Wechselwirkung hängt von der Lage der planaren π -Systeme der Nukleobasen ab. π - π -Basenstapelungs-Wechselwirkungen zwischen Purinen sind dabei immer stärker als zwischen Pyrimidinen.

Hunter (Hunter, 1993) hat vier prinzipielle energetische Beiträge für π - π Wechselwirkungen zwischen DNA Basenpaaren identifiziert. Diese sind

1. van der Waals Wechselwirkungen (variieren mit r^{-6})
2. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen partiellen Atomladungen (*atom-atom*; variieren mit r^{-1})
3. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Ladungsverteilungen verbunden mit der π -Elektronendichte unter und über der Ebene der Nukleobase ($\pi\sigma$ - $\pi\sigma$; variieren mit r^{-5})
4. Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Ladungsverteilungen verbunden mit der π -Elektronendichte und den partiellen Atomladungen (*atom- $\pi\sigma$* ; variieren mit r^{-4})

1.4.3 Solvation und Salzeffekte

Auch die Solvation spielt bei der Stabilität von Oligonukleotiden eine entscheidende Rolle. Der Grad der Hydratation bestimmt die Ausbildung zur A- oder B-Form-Helix. In Abhängigkeit von der Salzkonzentration im wässrigen Medium werden auch ausgebildete Sekundär- und Tertiärstrukturen stabilisiert (Edelhoch & Osborne, 1976). Durch ihr polyanionisches Phosphatrückgrat sind Oligonucleotide gut wasserlöslich. Ihre Polarität steigt durch Ausbildung der Doppelhelix-Struktur, da hier die Phosphordiester dem Solvens stärker exponiert sind. Oligonukleotide können daher gut mit Alkoholen gefällt werden.

Experimente mit DNA haben ergeben, dass die DNA Doppelhelix stark hydratisiert ist und dass diese Hydratation nicht gleichmäßig um die DNA vorliegt. Die Hydratation kann am besten durch ein zwei Schalen Modell von Wassermolekülen um die DNA Doppelhelix beschrieben werden. Die innere Schale besteht bei einer B-DNA aus 11-12 Wassermolekülen pro Nukleotid. Dabei ist die Bindungsstärke der Wassermoleküle zur DNA sehr unterschiedlich. Abbildung 1.6 zeigt, welche Wassermoleküle am stärksten und welche weniger stark sich an die DNA binden. Die Wassermoleküle an den

Nukleobasen lassen sich am leichtesten entfernen, gefolgt von denen am Zuckerring und zuletzt die Wassermoleküle am Phosphat. Entfernt man die Wassermoleküle um die Nukleobasen, so geht die Konformation der DNA von der B-Form in die A-Form über. Die innere Schale von Wassermolekülen hat immer direkten Kontakt zur Nukleinsäure und ist deshalb für Ionen nicht permeabel (Saenger, 1984).

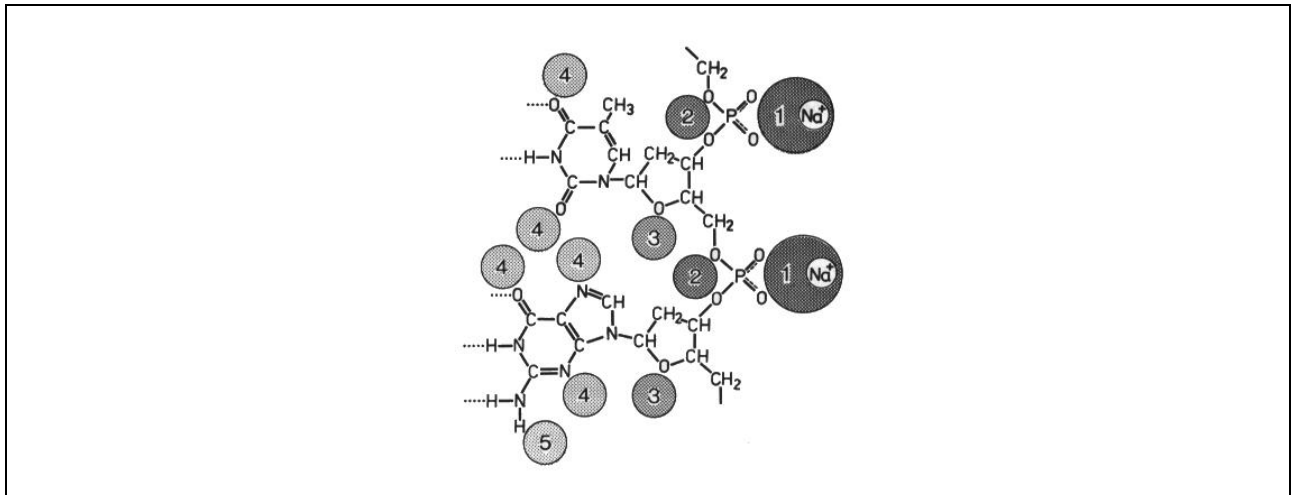


Abbildung. 1.6: Bevorzugte Hydratationsstellen einer B-DNA (Falk et al., 1963)

Die äußere Schale von Wassermolekülen ist nicht zu unterscheiden vom Restwasser. Sie hat keinen direkten Kontakt zur Nukleinsäure und ist auch permeabel für Ionen.

Die Oberflächenverteilung einer ungefalteten DNA wurde mit einer DNA-Doppelhelix verglichen. Charakteristisch für die Doppelhelix ist, dass die Phosphat-Sauerstoffe für Wassermoleküle fast maximal frei zugänglich sind, während die Nukleobasen zu ca. 80% bedeckt sind. Die Phosphatgruppe nimmt ca. 45% der frei zugänglichen Oberfläche einer Doppelhelix ein. Der Zucker dagegen nur ca. 35% und die Nukleobasen ca. 20%. Die Polarität einer DNA nimmt zu, wenn sie eine Doppelhelix ausbildet, da die polaren Phosphatgruppen in einer Doppelhelix stärker exponiert und damit für Wassermoleküle besser zugänglich sind als im ungepaarten Einzelstrang.

Einkristall Untersuchungen an A/T reichen Regionen einer B-DNA haben gezeigt, dass die kleine Furche mit einem Rückgrat aus Wasserstoffbrücken bildenden Wassermolekülen gefüllt ist. In einer A-DNA dagegen sind Filamente aus

Wassermolekülen miteinander und mit den Phosphatgruppen in der großen Furche verbunden (Blackburn & Gait, 1996).

1.5 Therapeutische Oligonukleotide

Während DNA der Träger der genetischen Information ist, ist RNA dagegen bei der *Realisierung* der genetischen Information beteiligt. Die Umschrift der DNA-Information von der statischen DNA auf die mobile m-RNA ist als Transkription bezeichnet. Dadurch wird die Information für die Zelle verfügbar. Diese messenger-RNA (mRNA; Jacob, 1961) tritt im Cytoplasma in die ribosomale Einheit ein und die Proteinbiosynthese wird gestartet ("Translation"). Dabei codieren jeweils Sequenztripletts (Codons) für bestimmte Aminosäuren (Ochoa, 1963; Nirenberg et al., 1963; Khorana, 1965). Dieses Prinzip, das mit wenigen Ausnahmen allen Zellen zugrunde liegt, wird als "zentrales Dogma der Molekularbiologie" bezeichnet (Abbildung 1.7). In seiner erweiterten Form berücksichtigt man auch die Replikation, d.h. die Vervielfältigung der DNA, und die Möglichkeit der reversen Transkription wie sie von Retroviren ausgeübt wird. Hierbei wird die virale RNA in die Wirtszelle eingeschleust und deren Zellmaschinerie wird dazu verwendet mittels einer reversen Transkriptase virale DNA zu synthetisieren, um so die Vermehrung des Virus zu sichern.

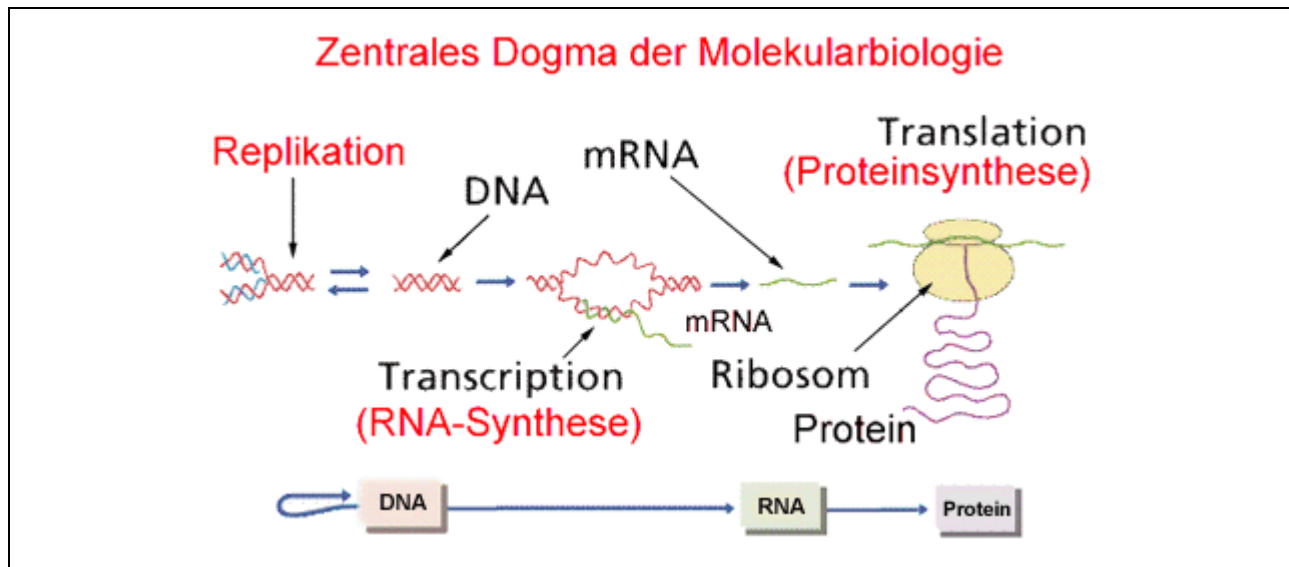


Abbildung 1.7: Zentrales Dogma der Molekularbiologie

Die in Abbildung 1.7 skizzierten zellulären Prozesse bieten ideale Angriffspunkte für therapeutische Oligonukleotide. Im Falle von Onkogenen, viralen RNAs oder z.B. krankhaften Mutationen im menschlichen Erbgut ist diese gezielte Inhibierung der Genexpression von besonderem therapeutischem Interesse. In den letzten Jahren hat RNA nun auch eine zentrale Rolle bei Zellprozessen gezeigt. Sie wird daher nicht nur verstärkt als wichtiges Kontrollelement und Mediator der Proteinbiosynthese angesehen, sondern auch als geeignetes Ziel, um die Genexpression zu regulieren.

1.5.1 Regulation der Genexpression

RNA-basierten Wirkstoffen wird das Potenzial zugeschrieben, selektiver, deshalb wirkungsvoller und weniger toxisch als herkömmliche Wirkstoffe zu sein. Manche halten es für möglich - Fortschritte in der RNAi-Therapie vorausgesetzt - dass in den nächsten Jahrzehnten eine neue Klasse von Arzneimitteln entstehen könnte. Um diese Anforderung zu erfüllen, wurden eine Reihe von Modifikationsmöglichkeiten an Oligonukleotiden untersucht.

Als eine neue Substanzklasse an Arzneimitteln kann man therapeutische Oligonukleotide bezeichnen (Hartmann, 2003). Regulation der Genexpression ist auf der

Ebene der DNA, der RNA als auch der Proteine möglich. Bis zum heutigen Tag haben sich mehrere Konzepte entwickelt: **1.** Antisense; **2.** Ribozyme; **3.** RNA-Interferenz (RNAi); **4.** Tripelhelices; **5.** Aptamere;

Tripelhelix-Konzept. Diese Methode ist auch als „Anit-Gen-Konzept“ bekannt. Mit der Methode, die Tripelhelix bildet, greift man auf der Stufe der DNA in den zellulären Mechanismus ein. Die Oligonukleotide blockieren bei dieser Methode DNA-Doppelhelix im Zellkern durch Anlagerung und Bindung einer dreisträngigen Helix. Die dreisträngige Helix wird idealerweise an Promoterregionen der RNA-Polymerase oder an Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren angreifen, so dass der Transkriptionsstart direkt verhindert werden kann. Die Hemmung kann dabei aus sterischen Gründen erfolgen oder durch eine Konformationsänderung der Helix, die durch die Anlagerung des dritten Stranges induziert worden ist (Batey, 1999, Engels, 2004).

Antisense- und RNAi-Konzept. Der Antisense-Ansatz richtet sich gegen die prä-mRNA oder die mRNA im Cytoplasma. Hierbei erfolgt die Watson-Crick-abhängige Anlagerung eines synthetischen Oligonukleotids an den RNA-Einzelstrang. Durch diese Blockierung der mRNA wird z.B. die Anlagerung des Spliceosoms oder der Eintritt der mRNA in die ribosomale Einheit verhindert (Zamecnik, 1978; Stephenson, 1978).

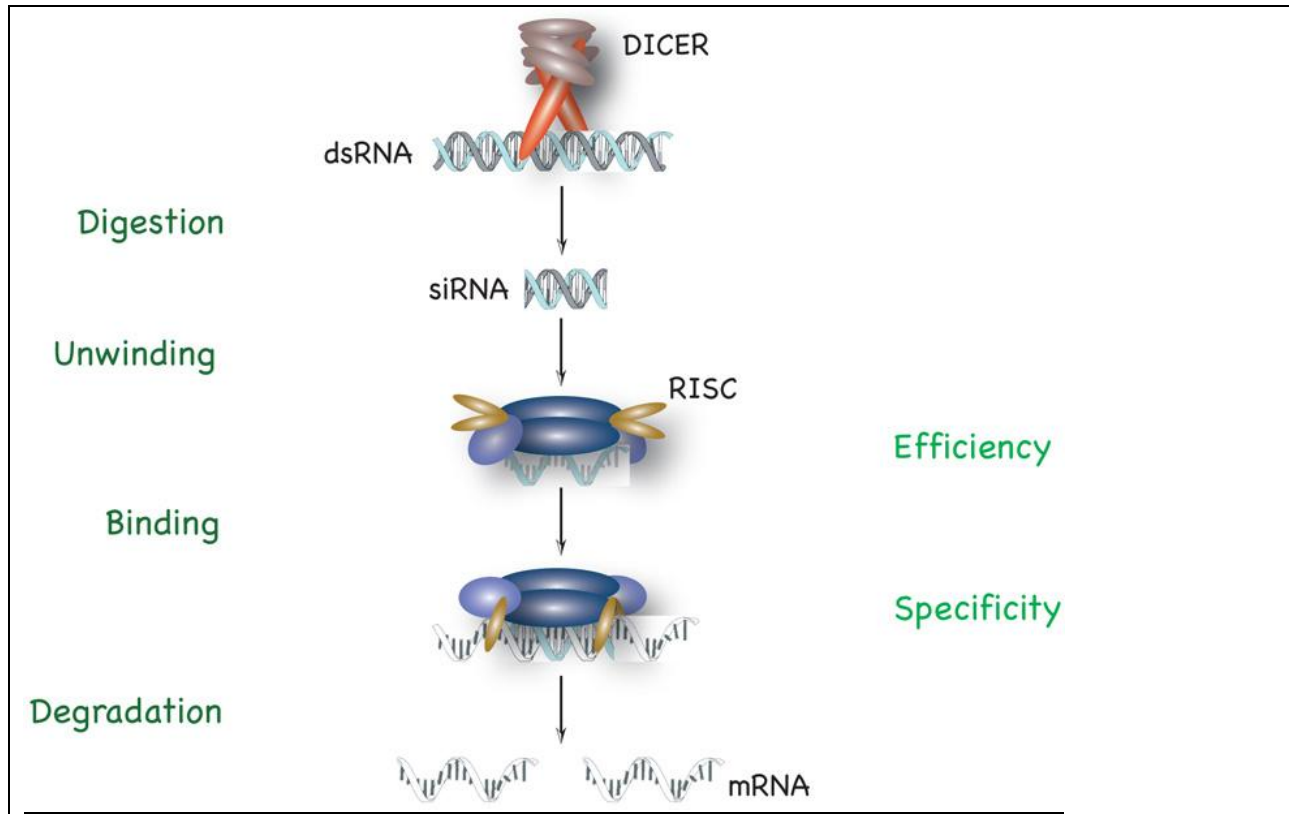


Abbildung 1.8: Mechanismus der RNAi

Die RNAi legt Gene gezielt still. Die 500-1500bp lange dsRNA in der Zelle wird durch den sogenannten Dicer, ein RNase III Enzym, in 21-24nt RNA Duplexe mit einem 3'Überhang von 2nt geschnitten. Diese siRNAs werden durch eine ATP-abhängige Kinase am 5' Ende phosphoryliert, in den RISC (RNA induced silencing complex) eingebaut und mittels einer Helicase entwunden. Dieser Enzym Komplex lagert sich mit dem siRNA-Einzelstrang an den komplementären mRNA Sequenzabschnitt an und blockiert somit die mRNA. Die mRNA wird nun 10 Nukleotide vom 3'Ende des siRNA-Stranges durch die Nukleaseaktivität des RISC, dem Slicer, irreversibel gespalten.

Aptamer-Konzept Das Aptamer-Konzept beruht auf der Inhibierung von Proteinen durch Oligonukleotide. Die eingesetzten RNA-Einzelstränge bilden definierte dreidimensionale Strukturen aus und binden hochspezifisch und mit großer Affinität an ihre Zielstruktur. Durch in vitro-Selektionstechniken (SELEX) können hochaffine RNA-Aptamere aus kombinatorischen Bibliotheken entwickelt werden (Tuerk, 1990; Famulok, 1999). Der SELEX-Prozess kann dabei auf beinahe beliebige Ziel-Strukturen angewandt

werden. Aptamere sind nur schwach immunogen und durchdringen Zellmembranen aufgrund ihrer geringeren Größe wesentlich besser als z.B. monoklonale Antikörper.

1.6 Universelle Basen

Nukleobasen-Analoga, die nicht zwischen den natürlichen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil unterscheiden, werden universelle Basen genannt. Die Eigenschaft als Mimetikum für alle vier natürlichen Basen mit gleichen Effekten zu fungieren, induziert eine beliebige Position im Watson-Crick-Basenpaarungsschema einnehmen zu können, welches wiederum mit noch wichtigeren Fragen wie z.B. der Duplexstabilität oder der Möglichkeit der Replikation verbunden ist.

Nach Loakes (Loakes *et al.*, 1997) sollte eine ideale universelle Base folgende Bedingungen erfüllen:

- Sie sollte mit den natürlichen Nukleobasen einen Duplex bilden, der als Start für eine Polymerase dienen kann.
- Sie sollte bei der Replikation den Einbau aller vier natürlichen Nukleobasen gegenüber sich selbst durch eine Polymerase ohne Unterscheidung zulassen.
- Sie sollte als Triphosphat von einer Polymerase, ohne Bevorzugung gegenüber allen vier natürlichen Nukleobasen eingebaut werden können.

Es ist bis zum heutigen Tage keine universelle Base gefunden worden, die alle diese Eigenschaften in sich vereinigt. Alle bisher bekannten universellen Basen erfüllen immer nur einen Teil der oben aufgeführten Eigenschaften.

Eine Strategie zur Entwicklung einer idealen universellen Base beruht auf der Verbesserung der Basenstapelungseigenschaften während das charakteristische Muster von Wasserstoffbrückendonator- und Akzeptorstellen der natürlichen Nukleobasen in den Hintergrund rückt. Das Resultat dieses Ansatzes ist eine Serie von Verbindungen, die alle von eher hydrophober Natur sind (Abbildung 9). Dies sind unter anderem 3-Nitropyrrol **1** (Nichols *et al.*, 1994), 5-Nitroindol **2** (Loakes & Brown, 1995), 4-Nitrobenzimidazol **3** (Seela *et al.*, 1996), 2,4-Difluoro-5-Methylbenzen **4** (Schweizer *et al.*

al., 1994) in der DNA und 2,4-Difluorobenzimidazol **5** und 2,4-Difluorobenzen **6** (Parsch, 2002) in der RNA (Abbildung 8).

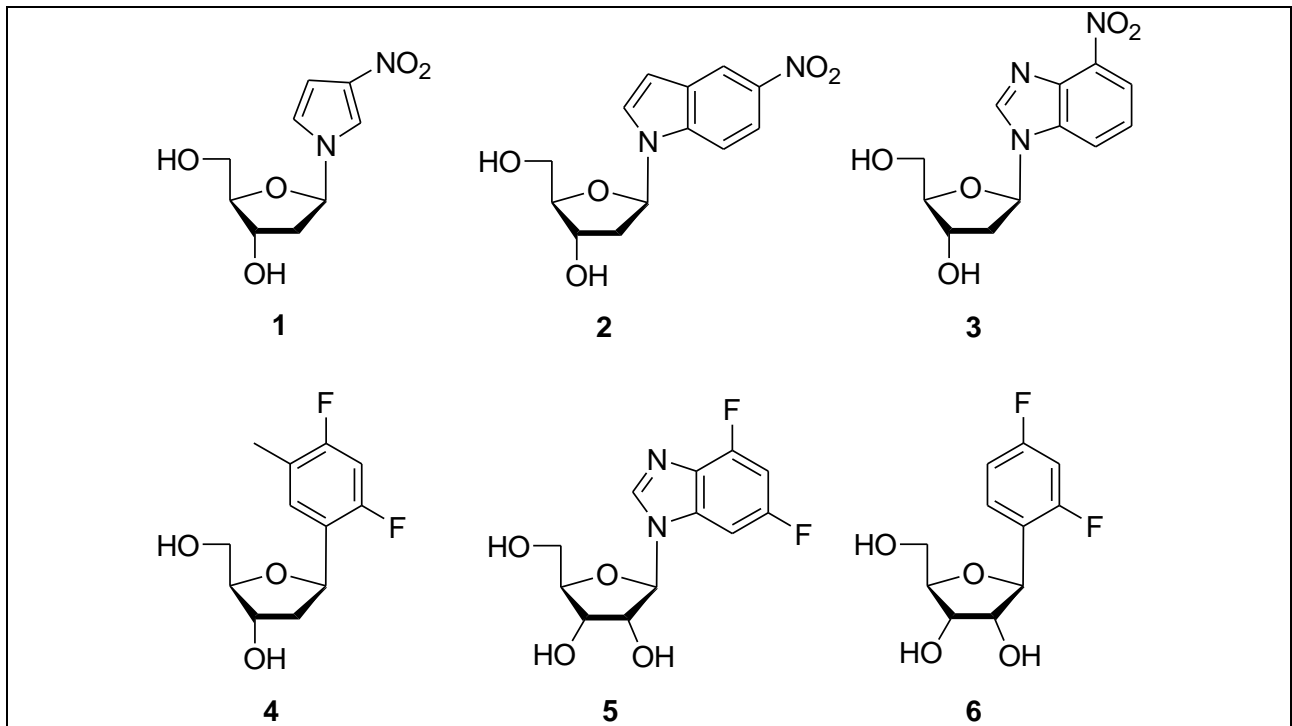


Abbildung 9: Universelle Basen

2 Einfluss von Fluor auf Nukleinsäuren

Fluor substituierte Analoga von natürlich vorkommenden Nukleinsäuren haben antivirale, antitumor und antimykotische Wirkung bewiesen. Eine Anzahl potentieller Wirkstoffe, in welchen die Fluorsubstitution der Schlüssel für ihre biologische Aktivität ist, wird intensiv untersucht. Es konnte in vielen Untersuchungen gezeigt werden, dass die fluorierten Nukleinsäureanaloga in ihrer dreidimensionalen Struktur kaum von denen der natürlich vorkommenden Nukleinsäuren abweichen. Durch diese strukturelle Ähnlichkeit binden die fluorierten Nukleinsäuren sehr schnell an Enzyme, für welche natürliche Nukleinsäuren die Substrate bilden. In diesen Komplexen wiederum spielt das Fluor aufgrund seiner Polarität und starken Elektronegativität eine signifikante Rolle in Bezug auf die biologische Aktivität (Bergstrom & Swartling, 1988). Das Fluoratom wird als Mimetikum für Wasserstoff, aufgrund seiner geringen Größe, für Hydroxylgruppen, wegen seiner ähnlichen Polarität und für Carbonylsauerstoffe, wegen ähnlicher Größe und Polarität, verwendet. Für Sauerstoff wird auch die CF_2 -Gruppe als isosterer Ersatz verwendet. Sie wird hauptsächlich als Analogon für Phosphatsauerstoffe verwendet. Außerdem sind Fluoratome in der Lage als Akzeptoren Wasserstoffbrücken zu bilden (Pankiewicz, 2000).

Besondere Eigenschaften von Fluor sind:

- hohe Elektronegativität
- relativ kleine Größe
- sehr niedrige Polarisierbarkeit

- drei nichtbindende Elektronenpaare
- sehr gute Überlappung zwischen F 2s und 2p Orbitalen mit dem dazugehörige Orbitalen der zweiten Periode des Periodensystems

Fluorierung einer Verbindung erhöht nicht immer die Lipophilie, aber auf der andere Seite das ist immer der Fall mit aromatischen Verbindungen. Fluorierung erhöht auch die Fähigkeit zu Wasserstoffbrückenbindung. Theoretische Rechnungen für die Bindungsenergie F...H variieren zwischen 2 und 3,2 kcal mol⁻¹, die mit O...H Wasserstoffbrücken verglichen werden können.

Fluornukleoside kann man in drei Gruppen aufteilen: Zucker-, Phosphat- und Basen-modifizierte Nukleoside.

2.1 Fluormodifikationen am Zucker

Fluoratome wurden an der Ribose Untereinheit von Nukleosiden an den Kohlenstoffen von C2' bis C5' eingeführt. Die mit Abstand meisten Verbindungen tragen das Fluoratom am C2' Atom. Fluoratome an C3' und C5' sind etwa gleich oft anzutreffen, wogegen Fluor an C4' immer noch recht selten zu finden ist.

2.1.1 C2'-Fluornukleoside

2'-Fluornukleosid Analoga sind aus zwei Gründen von Interesse für die Wissenschaft. Dies ist zum einen die signifikante biologische Aktivität von Vertretern dieser Molekülgruppe und zum anderen die Informationen, die diese Moleküle über die Rolle der 2'-OH Gruppe in Nukleinssäurestrukturen liefern.

Der Effekt einer 2'-Fluor-Substitution auf die Konformation der Ribose wurde intensiv untersucht, da diese auf der Stufe der Oligonukleotide für die Bindung an Enzyme und

die biologische Aktivität von fundamentaler Wichtigkeit ist. Röntgenstrukturanalysen von Nukleinsäuren zeigen, dass es zwei Vorzugskonformationen für die Ribose gibt. Dies sind die C2'-*endo* Form, wie sie in der B-DNA vorliegt und die C3'-*endo* Form, wie sie in der A-DNA vorliegt. Ein Übergang zwischen diesen beiden Zucker-Konformationen kann über den Weg einer Pseudorotation, welche durch den gesamten Ring wandert, geschehen. Die beiden Energieminima dieser Pseudorotation entsprechen der C2'-*endo* und der C3'-*endo* Form. Ein Übergang dieser beiden Konformationen verläuft bei Nukleosiden im Nanosekunden Bereich. NMR Untersuchungen haben gezeigt, dass die Konformation mehr von der Elektronegativität der Substituenten, als von deren Größe oder Fähigkeit Wasserstoffbrücken bilden zu können, abhängt (Ikehara, 1984; Uesugi *et al.*, 1983; Cheng *et al.*, 1983).

Die bedeutendsten Vertreter der Gruppe der 2'-Fluornukleoside sind 2'-Fluor modifizierte Thymidine und Cytidine. 2'-Fluoro-5-iodo-1- β -D-arabinofuranosylcytosin (FIAC, **7**) und 2'-Fluoro-5-iodo-1- β -D-arabinofuranosyluracil (FIAU, **8**) (Abbildung 2.1) sind potente und selektive Inhibitoren des Herpes Simplex Virus Typ 1 und Typ 2, des Varizella-Zoster-Virus und des Cytomegalie-Virus (Watanabe *et al.*, 1983; Watanabe *et al.*, 1984). Sie wirken dabei über ihre 5'-Triphosphate, die als Substrate für den Einbau in die Virus DNA mittels viraler DNA Polymerasen dienen (Herada *et al.*, 1987).

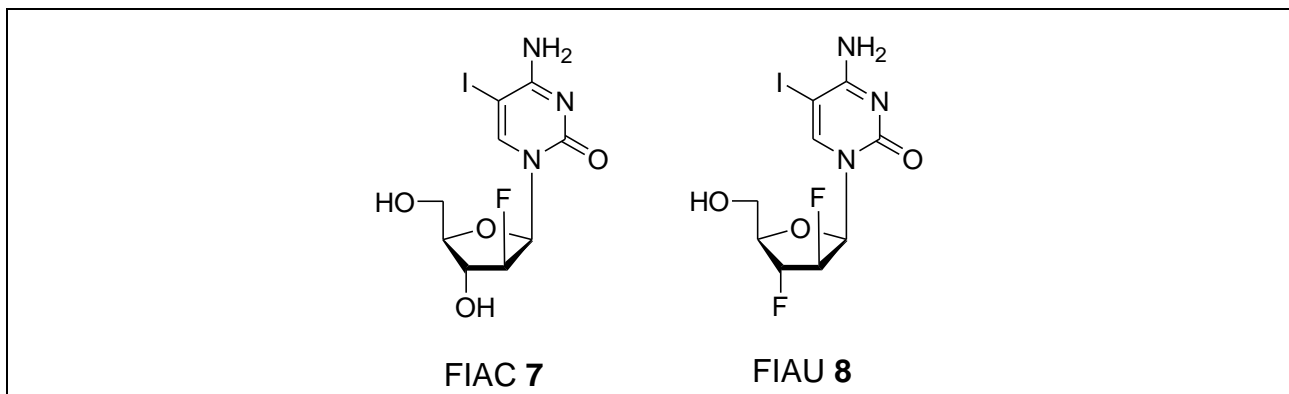


Abbildung 2.1: Antivirale 2'-Fluornukleoside

2',3'-Didesoxypurinnukleoside besitzen eine starke anti-HIV Aktivität. Das entsprechende Inosin Analogon (ddl) ist bereits in der klinischen Testphase. Die Stabilität gegenüber Säure ist allerdings gering, wodurch eine orale Applikation erschwert wird. Das entsprechende 2'-fluorierte Analogon weist dagegen eine

unbegrenzte Säurestabilität unter den Bedingungen auf, bei denen ddl und ddA binnen Minuten zersetzt werden. Die anti-HIV Aktivität der in 2'-Arabinostellung fluorierten ddl und ddA ist den nicht fluorierten Didesoxypurinnukleosiden dagegen vergleichbar (Pankiewicz, 2000).

2.1.2 C3'-Fluornukleoside

Die 3'-Fluor Substitution hat einen ähnlichen Effekt auf die 3'-Position der Ribose wie die 2'-Fluor Substitution auf die 2'-Position. NMR Untersuchungen zeigen, dass 2'-Fluor-2- desoxyuridin zu 78% in der C2'-*endo* Form vorliegt, während 3'-Fluor-2',3'-didesoxyuridin zu 88% in der C3'-*endo* Form vorliegt (Joecks *et al.*, 1983).

Der bekannteste Vertreter der Gruppe der 3'-Fluornukleoside ist 3'-Fluor-2',3'-didesoxythymidin (FLT). 1988 wurde entdeckt, dass FLT eine starke Wirksamkeit gegen HIV aufweist. Nach genauerer Untersuchung stellte sich heraus, dass die Wirksamkeit von FLT gegen HIV sogar größer ist als die von AZT (Balzarini *et al.*, 1988).

2.1.3 C4'-Fluornukleoside

Auf dem Gebiet der C4' Fluornukleoside wurden ungeachtet der Tatsache, dass es auch natürliche Vertreter dieser Gruppe gibt, wie das Antibiotikum Nucleocidin **9**, erst wenige Untersuchungen durchgeführt. Nucleocidin (Abbildung. 2.2) wurde 1957 isoliert und 1976 von Moffat zum ersten Mal synthetisch hergestellt (Jenkins *et al.*, 1976).

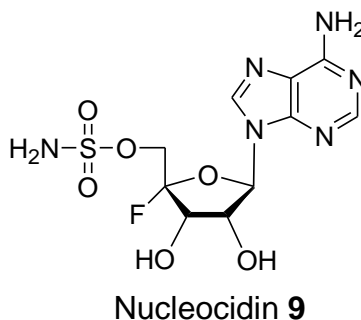


Abbildung: 2.2: Antibiotikum mit C4'-Fluoratom

2.1.4 C5'-Fluornukleoside

Es wurden verschiedene C5' Fluornukleoside synthetisiert, um die Möglichkeit der Phosphorylierung zu den entsprechenden Mono-, Di- und Triphosphaten in Zellen zu verhindern. Es wurde untersucht, ob diese Nukleoside ein Wirkungsspektrum besitzen, das nicht auf der Umwandlung in die entsprechenden Nukleotide beruht.

Synthetisch anspruchsvoll war der Ersatz der 5'-Hydroxylgruppe durch eine CF₂-Gruppe, um Difluormethylenphosphat Nukleotide darzustellen (Abbildung 2.3).

Durch den Einbau der Difluormethylengruppe **10** entstand eine -CH₂-CF₂-P-Verknüpfung, welche ein gutes Mimetikum für die natürliche -CH₂-O-P-Verknüpfung ist. Zu dem Einsatz der CF₂-Gruppe hat die Überlegung geführt, dass die CF₂-P Bindung unter natürlichen Bedingungen nicht mehr hydrolysierbar ist. Oligonukleotide mit diesen Molekülen wurden synthetisiert und werden untersucht.

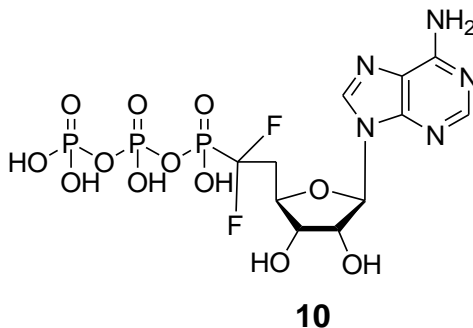


Abb. 2.3: 5'-Desoxy-5'-difluormethyl-adenosin-triphosphat

2.2 Fluormodifikationen an der Phosphatgruppe

Eine Phosphatgruppe kann modifiziert werden durch das Ersetzen einer Hydroxylgruppe mit einem Fluoratom und so wurde ein Fluorphosphonat erhalten. Die zweite Möglichkeit ist

Ersetzen einer Hydroxylgruppe durch eine CF_2 oder CHF Gruppe und so wird ein Fluoralkylphosphonat erhalten.

Bei Fluorphosphonaten durch das Ersetzen einer Hydroxylgruppe mit Fluoratom, trägt das resultierende Nukleotid bei physiologischem pH nur noch eine negative Ladung. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, den Einfluss der Ladungen auf die Enzym-Substrat Bindung zu untersuchen. Durch seine hohe Elektronegativität hat ein Fluoratom einen weiteren wichtigen Einfluss auf die Phosphatgruppe. Der pK_a wird durch die Fluorierung stark erniedrigt. Dies hat zur Folge, dass z.B. Mg^{2+} -Ionen nur noch schwach an die Phosphatgruppe binden (Vogler & Bridger, 1982).

Es hat sich gezeigt, dass eine CH_2 -Gruppe zwar der beste sterische Ersatz eines Sauerstoff-Atoms in Phosphonaten ist, dass die elektronische Ähnlichkeit durch die geringe Elektronegativität des Kohlenstoffs, verglichen mit Sauerstoff, aber doch sehr unterschiedlich ist. Blackburn hat gezeigt, dass Fluoralkylphosphonate bessere Analoga als Methylenphosphonate sind, da sie sowohl sterisch als auch elektronisch einem Sauerstoff-Atom in biologischen Phosphaten sehr nahe kommen (Blackburn, 1981).

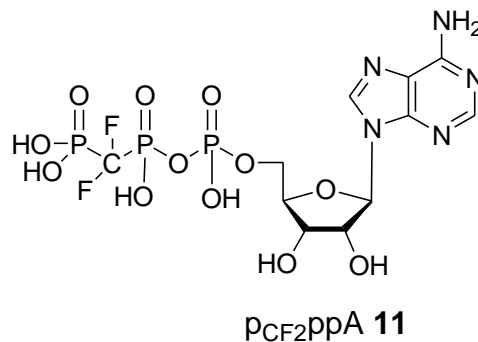


Abbildung 2.4.: Difluormethylenadenosin-Triphosphat

Untersuchungen mit β γ -Difluormethylen-Triphosphaten haben gezeigt, dass diese Verbindungen biologisch wirksamer sind als die entsprechenden β, γ -Methylen-Triphosphate, aber weniger wirksam als natürliche Phosphate. Versuche mit pCF_2ppA (Abbildung 2.4) haben gezeigt, dass pCF_2ppA ein guter Inhibitor für

Kaninchenmuskelpyruvatkinase und ein gutes Substrat für Rinderherzadenylatkinase ist (Blackburn *et al.*, 1986).

2.3 Fluormodifikationen an der Nukleobase

Es gibt drei verschiedene Gruppen von fluormodifizierten Nukleobasen. Dies sind modifizierte Pyrimidine, modifizierte Purine und fluormodifizierte Nukleobasen, deren molekulare Struktur weder auf der der Pyrimidine noch auf der der Purine beruht.

2.3.1 Fluormodifizierte Pyrimidine

Fluor substituierte Pyrimidin Nukleoside, wie z.B. 5-Fluor-2'-desoxyuridin (FdU, **12**) oder 5-Trifluormethyl-2'-desoxyuridin (F_3CdU , **13**) sind als therapeutische Reagenzien bewährt (Abb. 2.5.). Gegenwärtige Studien befassen sich hauptsächlich mit deren Pharmakokinetik und dem Einfluss des Fluoratoms auf die Struktur-Wirkungs-Beziehung und weniger mit neuen synthetischen Methoden.

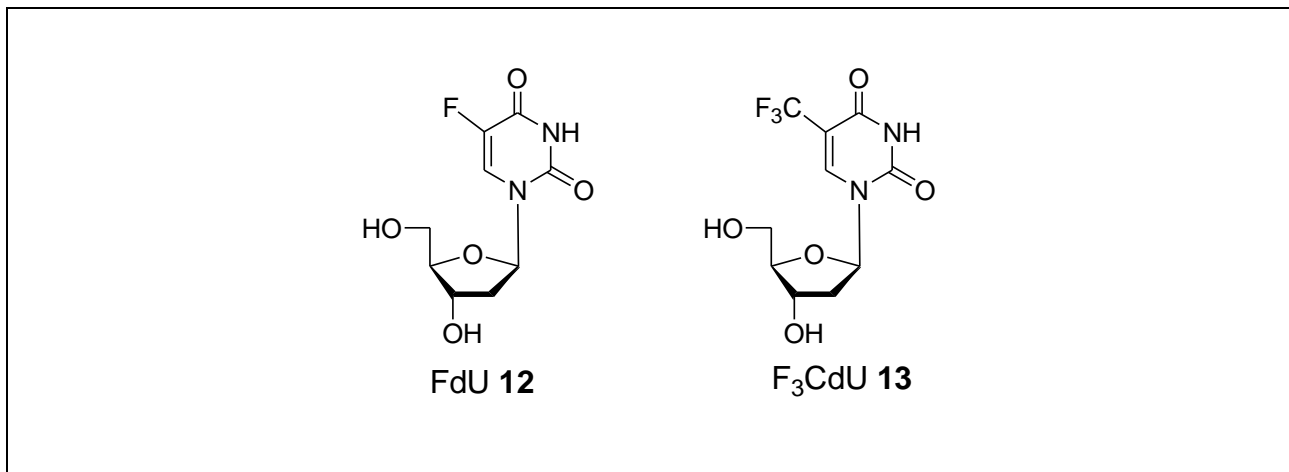


Abbildung 2.5.: Fluormodifizierte Pyrimidin-Nukleobasen

In den letzten Jahren sind Verbindungen mit längeren Seitenketten als Methylgruppen an C-5 verstärkt in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da Untersuchungen zu dem Ergebnis geführt haben, dass solche Verbindungen eine größere Aktivität gegen Herpes Viren aufweisen. Wichtig dabei ist, dass diese Verbindungen eine höhere Selektivität

gegenüber der Inhibierung der Herpes Virus Replikation zeigen als die klassischen Antiherpes Wirkstoffe, wie z.B. 5-Iod-2'-desoxyuridin oder 5-(Trifluormethyl)-2'-desoxyuridin (F_3CdU , **13**). Die Möglichkeiten zu C-5 Modifizierungen von Nukleosiden sind sehr groß und viele Verbindungen wurden und werden synthetisiert, um den Zusammenhang zwischen Struktur und antiviraler Aktivität zu klären. Die Untersuchungen haben aber auch gezeigt, dass es nicht die Fluorsubstitution per se ist, die für die Aktivität und Selektivität verantwortlich ist. F_3CdU **13** weist z.B. eine relativ hohe Aktivität gegenüber Herpes Simplex Virus Typ 2 auf. Die Einführung einzelner Fluoratome in die Seitenkette erhöht die antivirale Aktivität der Nukleinsäure Analoga. Es ist deshalb umso überraschender, dass Nukleinsäuren mit voll fluorierten Seitenketten ihre antivirale Aktivität vollständig verlieren.

2.3.2 Fluormodifizierte Purine

Nur wenige Beispiele sind zu finden, welche Purine als antivirale Wirkstoffe untersucht haben. Diese sind schon in den späten sechzigern bzw. frühen siebziger Jahre synthetisiert worden. Die sind 2-Fluoradenosin (2FA, **14**) und 6-Fluornebularin (6FN, **15**) (Abbildung 2.6.).

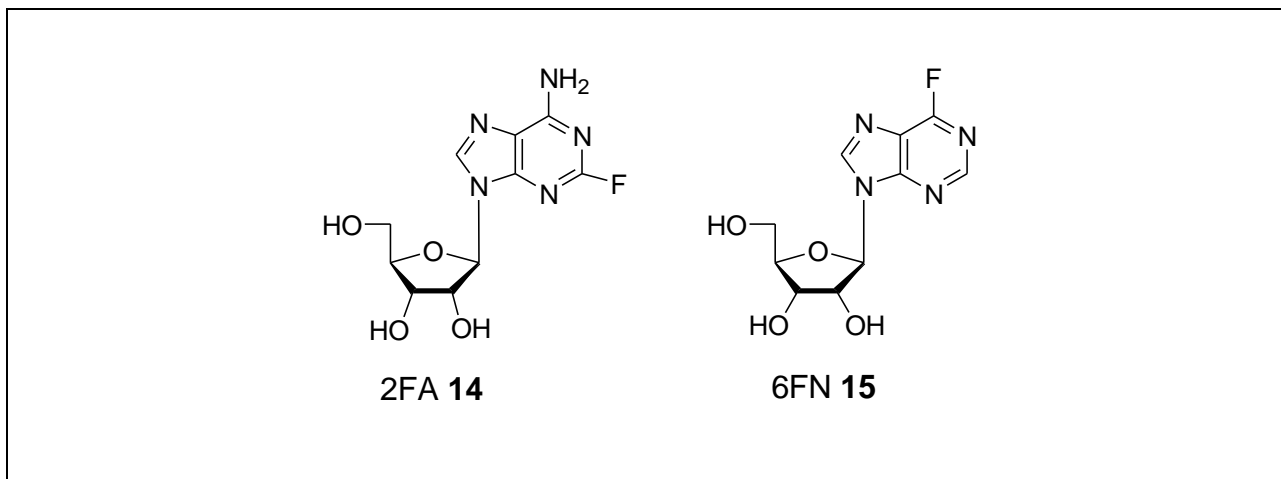


Abb. 2.6: Fluormodifizierte Purin-Nukleobasen

Durchgeführte Untersuchungen haben keine antivirale Aktivität gezeigt.

2.4 Fluormodifikationen an RNA-Oligonukleotiden

Um den Einfluss der aromatischen Fluorsubstituenten auf die Stabilität von RNA-Duplexen zu untersuchen, wurden die fluorierten Basenanaloga in RNA eingebaut. Bei den 2,4-Difluorobenzen **16** und 4,6-Difluorbenzimidazol **17** (Abbildung 2.7.) handelt es sich um universelle Basen, die bei der Basenpaarung nicht zwischen den vier natürlichen Nukleosiden unterscheiden. Bei beiden Nukleosiden konnten durch die Kristallstrukturanalysen C-F...H Wasserstoffbrücken nachgewiesen werden (Parsch, 2002).

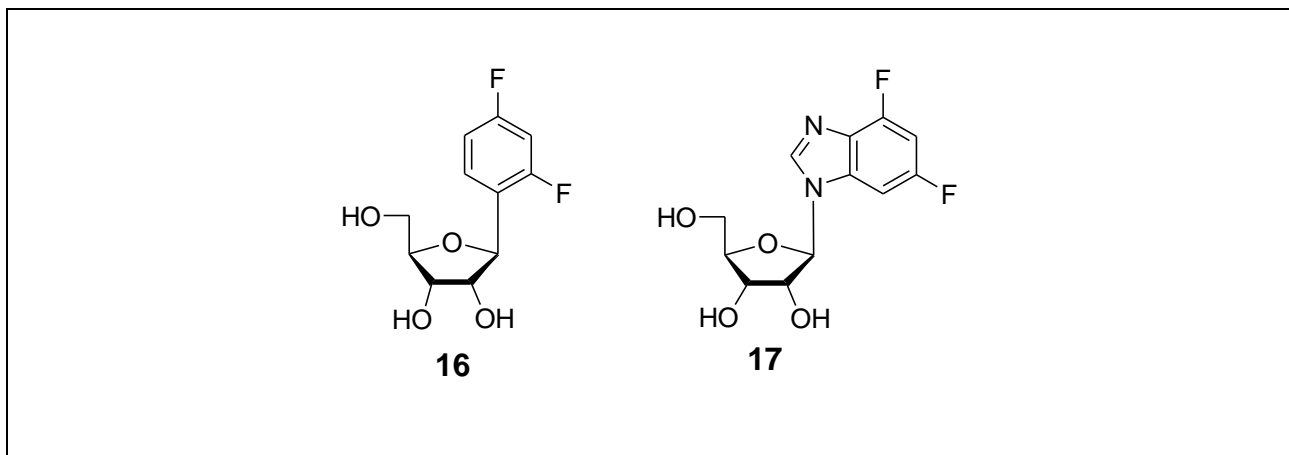


Abbildung 2.7.: Fluormodifizierte Basenanaloga

Die thermodynamischen Untersuchungen legten die Grundlage für die Entwicklung von chemisch modifizierten Hammerhead-Ribozymen, die in der Lage sind Punktmutationen zu tolerieren. Aus den kinetischen Analysen konnte nachgewiesen werden, dass das Ribozym welches mit dem 2'-Aminoethyl substituierten 2,4-Difluorbenzimidazol modifiziert ist in der Lage ist Punktmutationen zu tolerieren. Es weist bei Watson-Crick „mismatch“-Basenpaaren im Vergleich zum natürlichen Ribozym eine um Faktor 13 erhöhte katalytische Aktivität auf (Klöpfer, 2004).

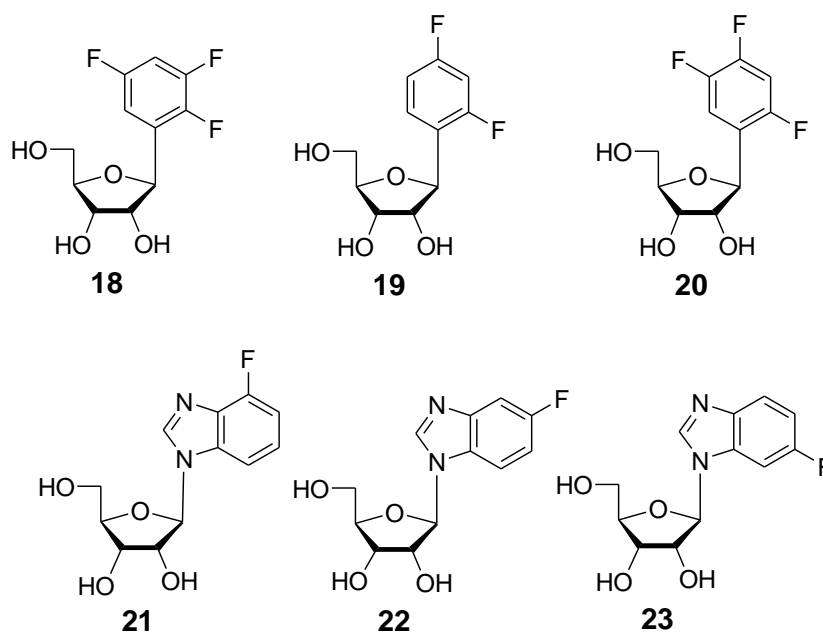


Abbildung 2.8.: *Fluormodifizierte Basenanaloga*

Die weiteren stabilisierenden Effekte von Fluor auf die RNA-Duplexe wurden durch die Messungen von thermodynamischen Parametern zwischen zwei fluorierten Basenanaloga durchgeführt.

Die RNA-Duplexe wurden zwischen allen mögliche Kombinationen gebildet. Beim Vergleich von nicht-natürlichen Basepaaren sind die stabilsten Basenpaare mit 2,3,5-Trifluorobenzen **18**. Die stabilsten Basenpaare zwischen Benzol- und Benzimidazol-Modifikationen sind zwischen 2,4-Difluorobenzen **19** und 2,4,5-Trifluorobenzol **20** auf der einen Seite und 4-Fluorobenzimidazol **21**, 5-Fluorobenzimidazol **22** und 6-Fluorobenzimidazol **23** (Abbildung 2.8.). Im Vergleich mit nichtfluorierten Basen zeigen die fluorierte Basenanaloga geringere Destabilisierung. Da sich diese Basenpaare von dem Benzol und Benzimidazol nur durch die Fluoratome unterscheiden, muss die Stabilisierung der RNA-Duplexe durch Wechselwirkungen des Fluors zustande kommen (Živković, 2005)

3 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuartiger artifizierender Basenanaloga. Fluorierte Benzimidazole haben sich als universelle Basen gezeigt (Parsch, 2002). Im Vergleich zu Benzimidazole unterscheiden sich die Indole durch ein Stickstoffatom in Fünfring-System. Dadurch werden die Elektronenverteilung und die Elektronendichte verändert. Ausgewählte Indol-Bausteine befinden sich in Abbildung 3.1.

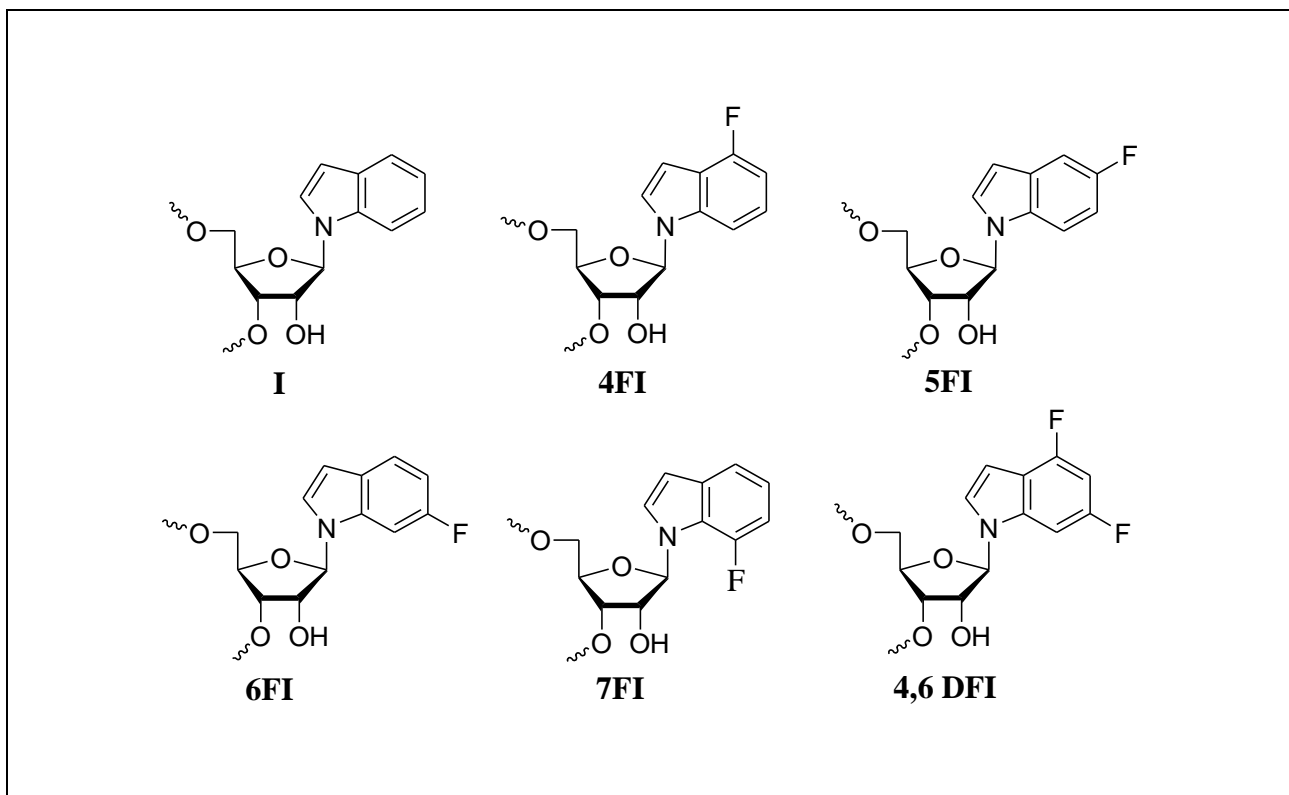


Abbildung 3.1: Zu synthetisierende Fluorindol-Nukleoside

Um die Effekte auf die RNA-Stabilität zu untersuchen sollten die Phosphoramiditbausteine synthetisiert werden. Nach erfolgter Synthese der Nukleosid-Analoga sollten diese in ihre Phosphoramiditbausteine überführt und in 12mer RNA-Stränge mittels automatisierter Festphasensynthese eingebaut werden. Diese Oligonukleotide sollten nach erfolgter Aufreinigung und Charakterisierung mittels UV- und CD-Spektroskopie untersucht werden. Dazu sollten RNA Duplexe gebildet und der Einfluss der synthetisierten Bausteine durch Paarung mit natürlichen Nukleotiden auf die Stabilität der Duplexe bestimmt werden. Es sollte ermittelt werden, ob die fluorierten Bausteine Wasserstoffbrücken bilden können und wie groß ihre Basenstapelungs- und Solvatationsbeiträge für die Stabilität des RNA-Duplex sind. Hierzu sollten die thermodynamischen Daten aus den UV-spektroskopischen Untersuchungen ermittelt werden. Mit Hilfe von CD-Messungen sollte der Einfluss der modifizierten Bausteine auf die Struktur der RNA-Doppelhelix untersucht werden.

Um ein klares Bild zu bekommen wie die Elektronendichte bzw. Basenstapelung die RNA-Stabilität beeinflusst sollten auch 7-N-Purin Nukleosid, als 4,6-Difluorbenzimidazol und 9-Deazapurin, als 4,6-Difluorindol Analoga synthetisiert werden (Abbildung 3.2).

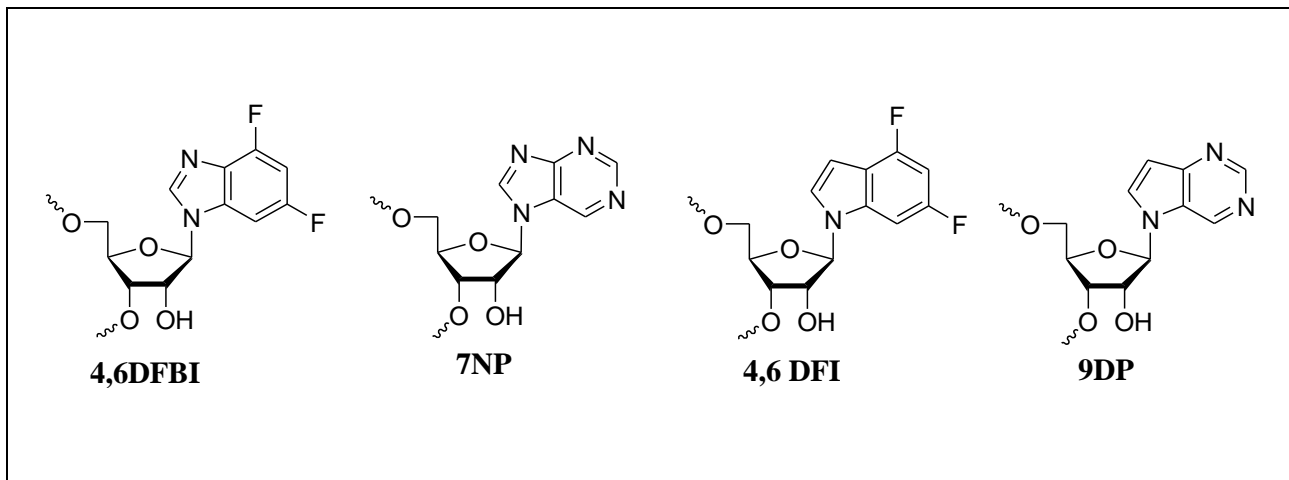


Abbildung 3.2.: Zu synthetisierende 7-N-Purin und 9-Deazapurin-Nukleoside

Soweit möglich sollten die modifizierten Bausteine kristallisiert werden, um die Bedeutung der Fluoratome und Basenorientierung auf die Struktur der Nukleoside und auf die Kristallpackung zu untersuchen.

4 Chemische Synthesen

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Entwicklung und Synthese artifizierter universeller Nukleobasen, die RNA-Duplexe nicht destabilisieren. Die Stabilität von RNA-Duplexen wurde durch die Bestimmung der thermodynamischen Parameter untersucht. Die gesuchten Moleküle sollten zugleich in ihrer Struktur möglichst ähnlich zu den natürlichen Nukleosiden sein, um die Struktur der resultierenden RNA so wenig wie möglich zu verändern. Dabei hat sich Fluor als das beste Mitetikum für Sauerstoff erwiesen, da es sowohl in der Größe als auch in der Polarität dem Sauerstoff am nächsten kommt (Pankiewicz, 2000). Diese Voraussetzungen schränkten die Auswahl für die gesuchten Moleküle stark ein. Basierend auf den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, sollte die Gruppe von fluorierten Indole untersucht werden, wobei es sich bei den fluorierten Nukleosiden um universelle Basen handelt. Als genereller Zugang zu den Indolen dienen die geeignet substituierten Fluorbenzole. Ein weiterer bedeutender Grund für die Untersuchung war, dass Indol als Strukturfragment in vielen Naturstoffen vorkommt (Abbildung 4.1.).

- Alkaloide (fast alle haben therapeutische Wirkung);
- Hormone (Melatonin);
- Farbstoffe (Indigo, Purpur);
- Aminosäure (Tryptophan);

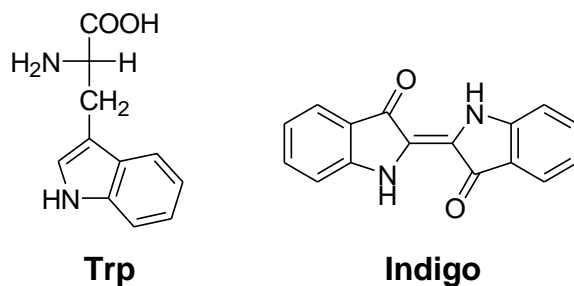


Abbildung 4.1. Bekannte Naturstoffe mit Indol Strukturfragmente

Die fluorierten Indole wurden so ausgewählt, dass das Fluoratom dieselbe Position, wie bei Fluorbenzimidazolen hat. Damit bekommt man ein klares Bild, welche Änderungen wegfallendes Stickstoffatom im Fünfring-System auf die RNA Stabilität bringt. In Abbildung 4.2. befinden sich synthetisierte Indol-Nukleoside.

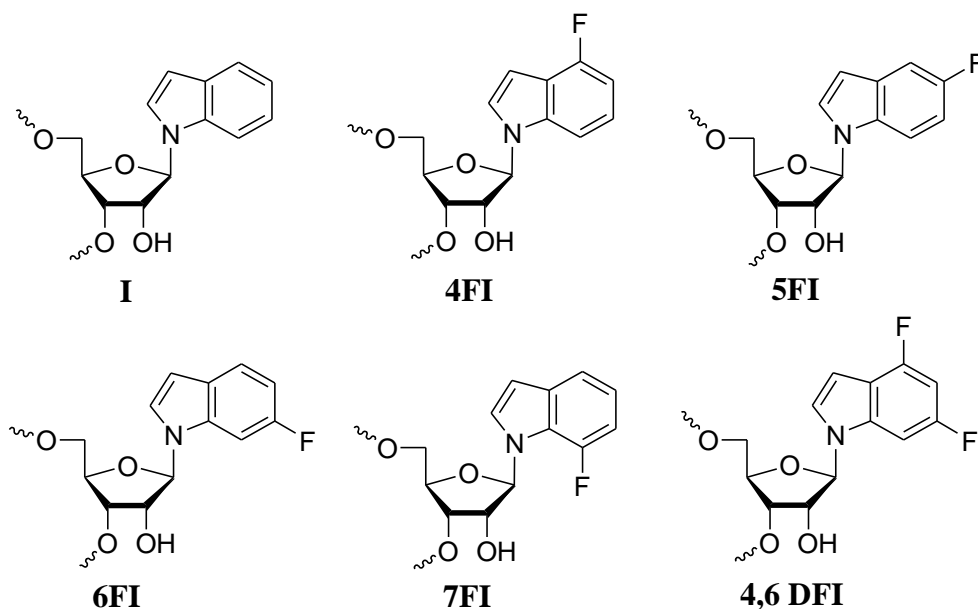


Abb.4.2.: Fluorindol-Nukleoside

4,6-Difluorindol-Nukleosid wurde als Analogon zu 4,6-Difluorbenzimidazol synthetisiert. Beim Vergleich der beiden Nukleoside wurde ersichtlich, dass das Indol-Nukleosid eine bessere universale Base ist. Diese Ergebnisse haben hier neue

Forschungsperspektiven eröffnet. Ausgehend davon, wurden die Methoden aus dem Bereich der strukturellen Bioinformatik, Moleküldynamiksimulationen und freie Energie-Rechnungen verwendet um noch weniger RNA-Duplex destabilisierende Nukleoside zu finden. Es wurden noch zwei Nukleoside so ausgesucht, 7-*N*-Purin-Nukleosid als Analoga zu 4,6-Difluorbenzimidazol und 9-Deaza-Purin als Analoga zu 4,6-Difluorindol.

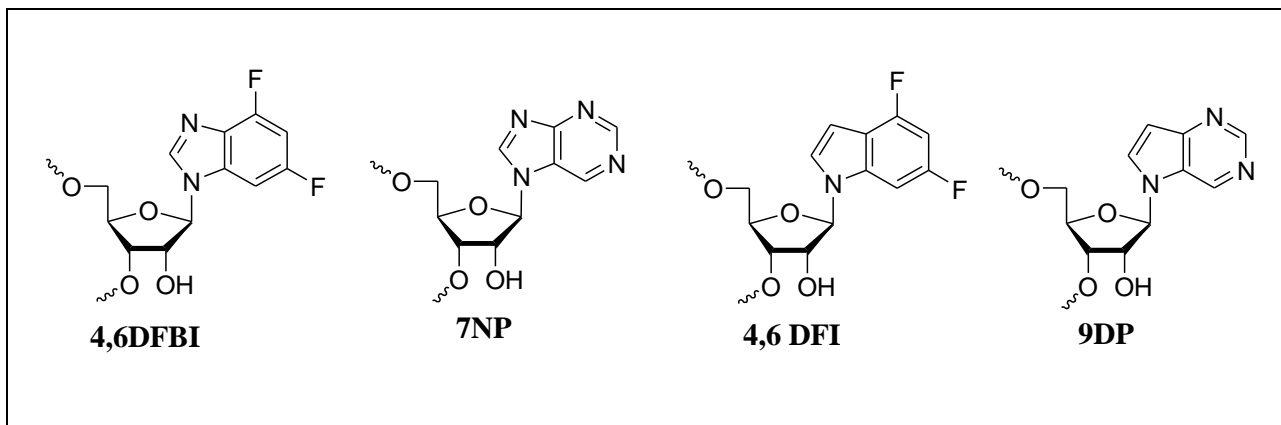


Abb.4.3.Modifizierte Basenanaloga

4.1 Darstellung ausgewählter artifizieller Basen

4.1.1 Darstellung der Fluorindole

Zur Synthese des Fluorindol-Nukleosiden müssen zunächst Fluorindole (nicht kommerziell erhältlich) hergestellt werden (Nichols, 2000).

Ausgehend vom käuflichen Fluorbenzaldehyd wurden im ersten Reaktionsschritt eine 2-Azido-propenoat Gruppe über den Aldehyd eingeführt. Die Optimierung der Reaktion erfolgte durch eine verlängerte Reaktionszeit sowie eine erhöhte Reaktionstemperatur. Zur Synthese dieser Zwischenprodukte wurde die basische Lösung auf -20°C abgekühlt. Nach Zugabe des Aldehydes wurde zunächst bei -20°C und anschließend bei +4°C gerührt. Dadurch wurde die Ausbeute im Vergleich zu allgemein üblichen Ergebnissen der Literatur verdoppelt. Die entstandenen Zwischenprodukte wurden nur durch

Extraktion gereinigt und direkt weiter eingesetzt. Die Zyklisierung erfolgt unter Rückfluss in Xylen. Nach vier Stunden Reaktionszeit wurden die Produkte **24**, **25** und **26** erhalten. Nach der quantitativen Verseifung mit NaOH, wird die Carboxylgruppe durch Decarboxylierung mit Cu⁰ als Katalysator in NMP entfernt. Nach der Aufreinigung wurden die fluorierten Indole **27**, **28** und **29** isoliert (Abbildung 4.4.).

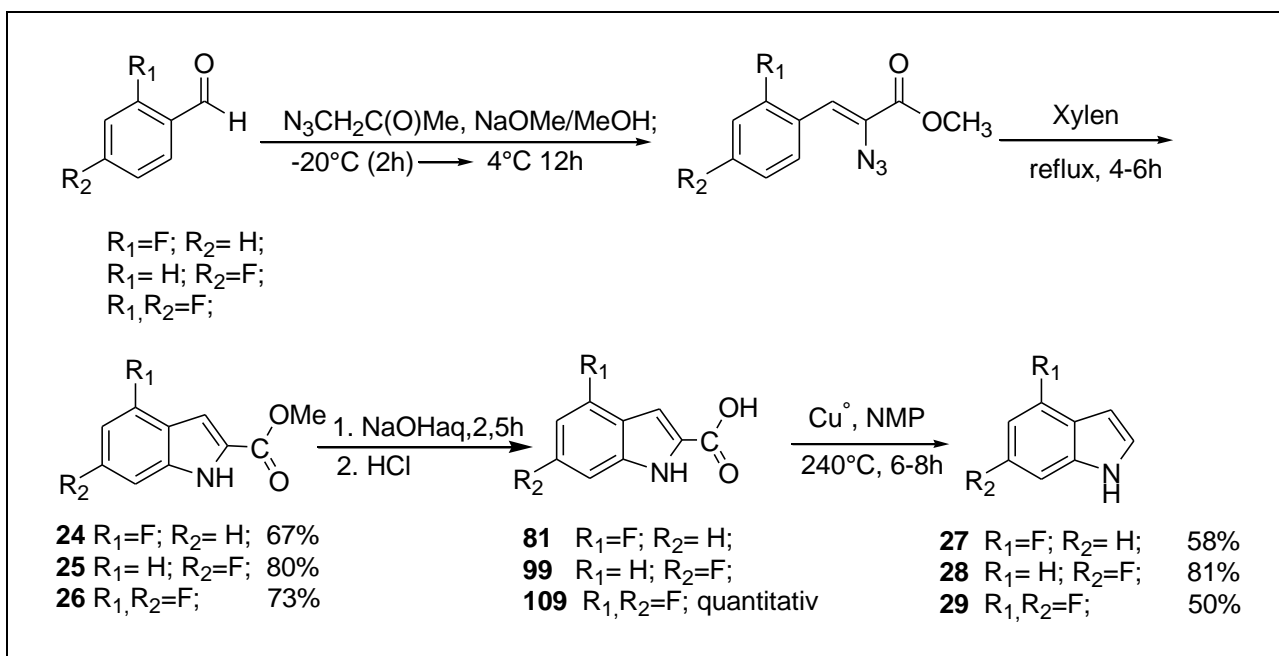


Abb.4.4. Darstellung von Fluorindole **27**, **28**, **29**

4.1.2 Darstellung von 9-N-Deazapurin

Zur Synthese der 9-N-Deazapurin wurde zunächst *3H*, *5H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on **31** als basisches Ringsystem synthetisiert (Furneaux, 1999). Die Reaktion verläuft in zwei Stufen, ohne Aufreinigung. Ausgehend von käuflichem Isoxazol wurde unter 30minutiger Reaktion in basischen Bedingungen erst der Isoxazolring geöffnet und danach die Base neutralisiert. Ein so gebildetes Zwischenprodukt wurde unter Anionangriff von Diethylaminomalonat unter basischen Bedingungen zyklisiert zu 3-Amino-2-ethoxycarbonylpyrrol **30**. Im nächsten Schritt wurde das *3H*, *5H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on **31** unter Reflux mit Formamidin-acetat als ein Präzipitat bekommen. Das Produkt ist ohne Aufreinigung analytisch sauber. Die Verbindung 6-Chloro-9-deaza-purin **32**

wurde aromatisiert durch die Chlorierung. Die Reaktion erfolgte mit POCl_3 als Reagenz und auch als Lösungsmittel, wegen schlechter Löslichkeit des Edukts. Nach weiteren drei Stunden Reflux konnte das Produkt **32** als weißer Feststoff in 85iger Ausbeute erhalten werden. Das gewünschte Produkt 9-Deazapurin **33** konnte in 76%iger Ausbeute mittels katalytischer Hydrierung erhalten werden (Abbildung 4.5.).

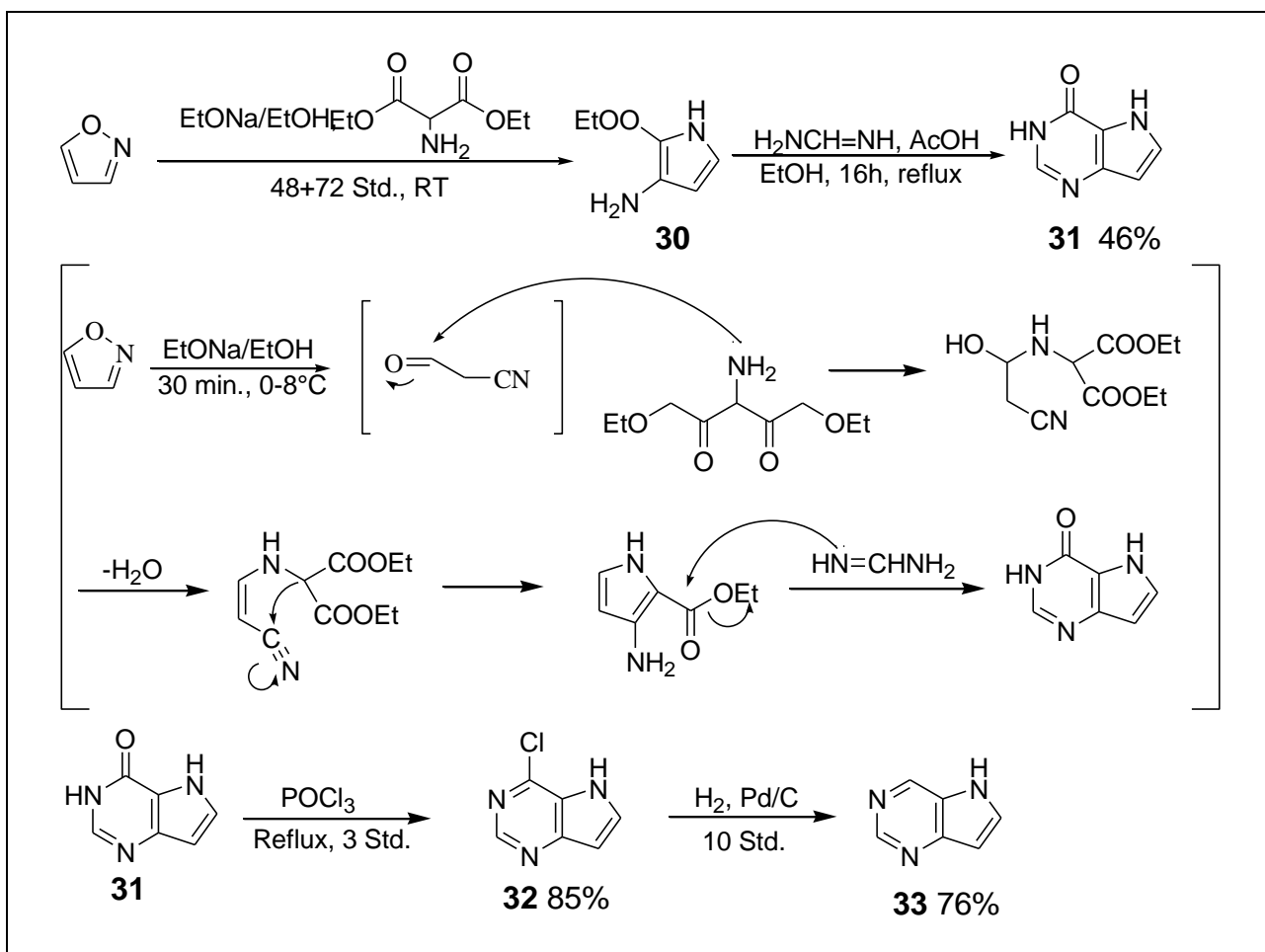


Abb. 4.5.: Darstellung von 9-N-Deazapurin mit mechanistischer Darstellung

4.2 Glycosylierung Reaktionen

Die Methode zur direkten Glycosylierung der Indolen ist noch nicht bekannt, mit Ausnahme, wenn Indol in Position 2 eine aktivierende Gruppe hat. Es gibt mehrere Möglichkeiten, ein Indol-ribonukleosid zu synthetisieren: enzymatisch (Abbildung 4.6. III) oder über Indolin (Abbildung 4.6.IV). Die beiden Methoden haben sehr schlechte

Ausbeuten. Die Methode über Desoxy-nukleosid hat mehrere Syntheseschritte mit hohen Ausbeuten (Abbildung 4.6. II).

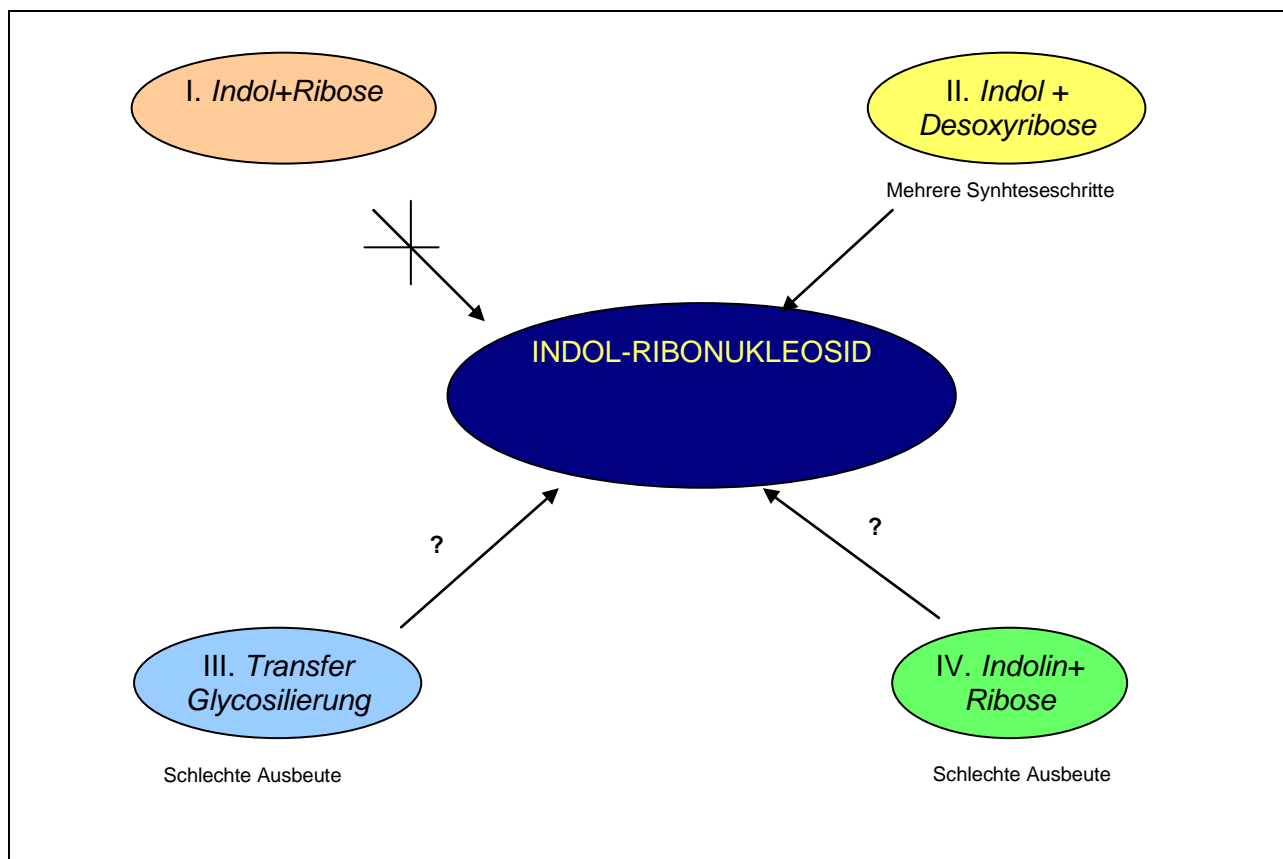


Abbildung 4.6.: Die Mögliche Synthesewege Indol-Ribo-Nukleosid

Erste Methodeauswahl war die direkte Glycosylierung mit geeignet geschützter Ribose (Abbildung 4.7.). Die Methode war nicht erfolgreich und die Optimierung durch veränderte Basen und Reaktionszeiten lieferte das gewünschte Produkt in maximaler Ausbeute von 4%. Aufgrund mehrerer entstandener Nebenprodukte, von denen nur die Gewünschte vollständige Analytik hat, war die Trennung erschwert. Alle Reaktionen befinden sich in Abbildung 4.7. mit tabellarisch vorgestellten Bedingungen der Reaktionen.

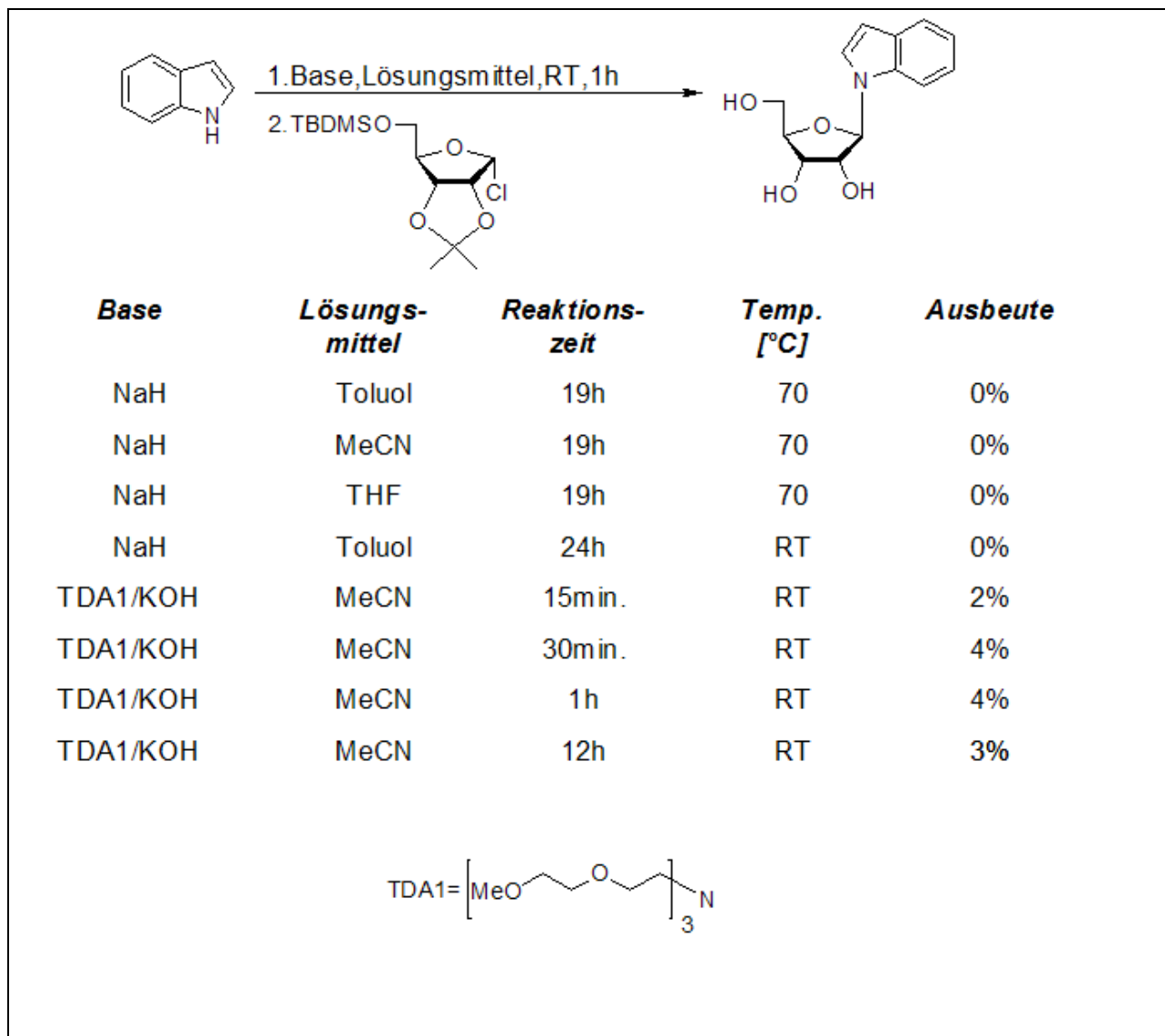


Abbildung 4.7.: Versuchte Glycosilierungsreaktionen

Die Desoxy-Glycosylierung mit einer geeignet geschützten α -Cl-Desoxyribose liefert das gewünschte Nukleosid in hohen Ausbeuten. Aufgrund des Anionangriffs und einer kurzen Reaktionszeit liefert die Glycosylierungsreaktion nur reine β -Nukleoside.

4.2.1 Darstellung von 3,5-Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranosylchlorid

Zur Synthese der Indol-Nukleoside und des 9-*N*-Purin-Nukleosids muss zunächst 3,5-Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranosylchlorid (Rolland et al. 1997) synthetisiert werden (Abbildung 4.8.). Die Synthese verläuft in drei Syntheseschritten ohne Aufreinigung. Als Ausgangsprodukt dient 2-Desoxy-D-Ribose. Die Methylierung am anomeren Zentrum erfolgt unter Säurekatalyse mit 1%-iger methanolischer HCl-Lösung.

Die kurze Reaktionszeit gewährleistet, dass nur die reaktivste Hydroxygruppe methyliert wird **34**, nicht jedoch die 3 und 5-Position. Nach Neutralisation mit NaHCO_3 können die Toluoylschutzgruppen eingeführt werden **35**. Diese sind sowohl unter den Bedingungen der Glycosilierung als auch im sauren Medium der anschließenden Chlorierung stabil. Der wichtigste Punkt dieser Reaktion ist die Chlorierung: in einem Temperaturbereich von bis 25°C fällt das gewünschte α -Isomer in konzentrierter Essigsäurelösung aus. Dieser Reaktionsschritt bestimmt die Reinheit des Produktes. Die entstandene α -Chlorofuranose **36** isomerisiert in saurer Lösung. Deswegen muss die Reaktion schnellstmöglich beendet und aufgearbeitet werden. Maximale HCl Konzentration wird mit einer Mischung aus Essigsäure, Wasser und Acetylchlorid erreicht. Durch die Aufarbeitung muss der Rest der Essigsäure komplett entfernt werden, sonst ist die Hydrolyse und Isomerisierung bei der Lagerung möglich. Die erreichten Ausbeuten mit dieser Reaktionsführung variieren zwischen 60 und 70%. Das so erhaltene Produkt enthält weniger als 0,1% des β -Isomeres.

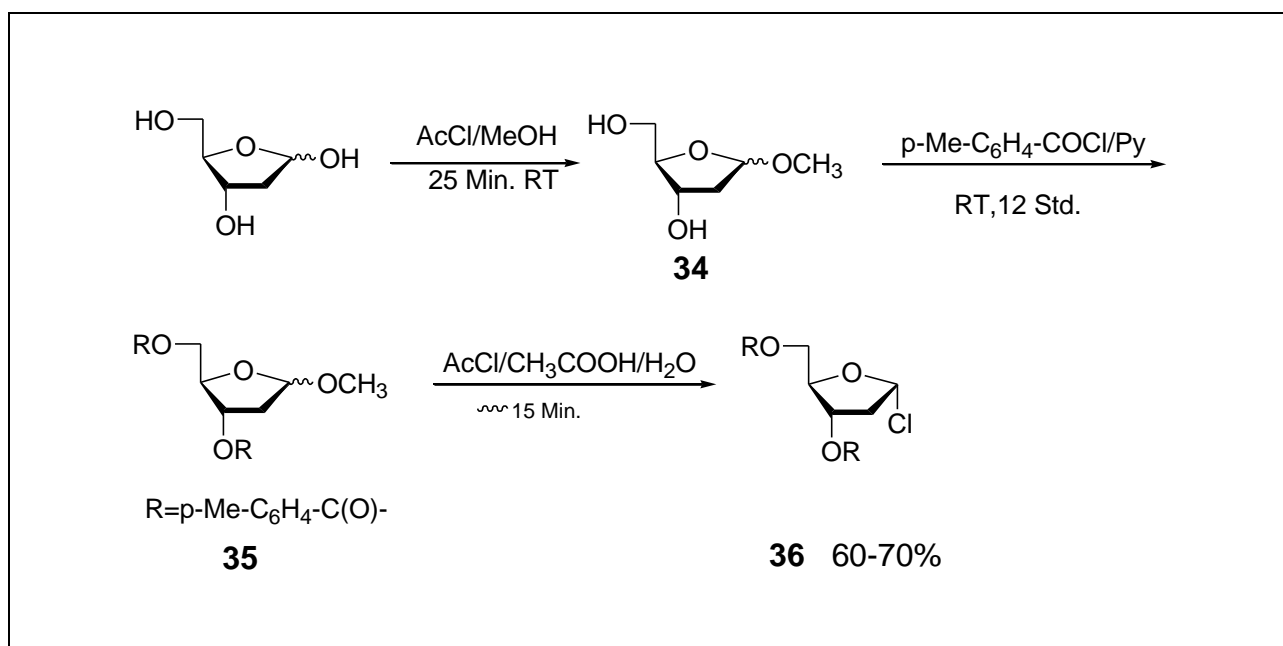


Abbildung 4.8.: Darstellung von 3,5-Di-O-p-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranosylchlorid

4.2.1.a Die Glycosilierungs-Reaktion von Indole und 9-Deazapurin

Die Synthese des Indol Ribonukleosides und 9-N-Deazapurins besteht aus mehrstufigen Prozessen. Durch Deprotonierung der Nukleo-Base mit Natriumhydrid unter 10

minutigen Rühren wird das Anion gebildet. Die Glycosylierungsreaktion läuft sehr schnell (20 bis 30 min.) unter einem Anionangriff. Dadurch werden nur reine β -Nukleoside (**37**) in fast quantitativen Ausbeuten geliefert. Die Reaktion findet in der konzentrierten Lösung statt. Die Ausbeuten Glycosylierungsreaktionen für Indole liegen zwischen 90% und 99%. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des 9-Deazapurin liefert die Reaktion in dies Fall eine Ausbeute von weniger als 90%. Eine Verlängerung der Reaktionszeit verbessert die Ausbeute nicht, weil der α -Cl-zucker isomerisiert wurde und dadurch auf DC ein zweites Isomer beobachtet werden konnte. Nach der Glycosilierung werden die Toluoylschutzgruppen unter basischen Bedingungen abgespalten (**38**). Die Reaktion erfolgt mit katalytischer Menge der Bases bei Raumtemperatur.

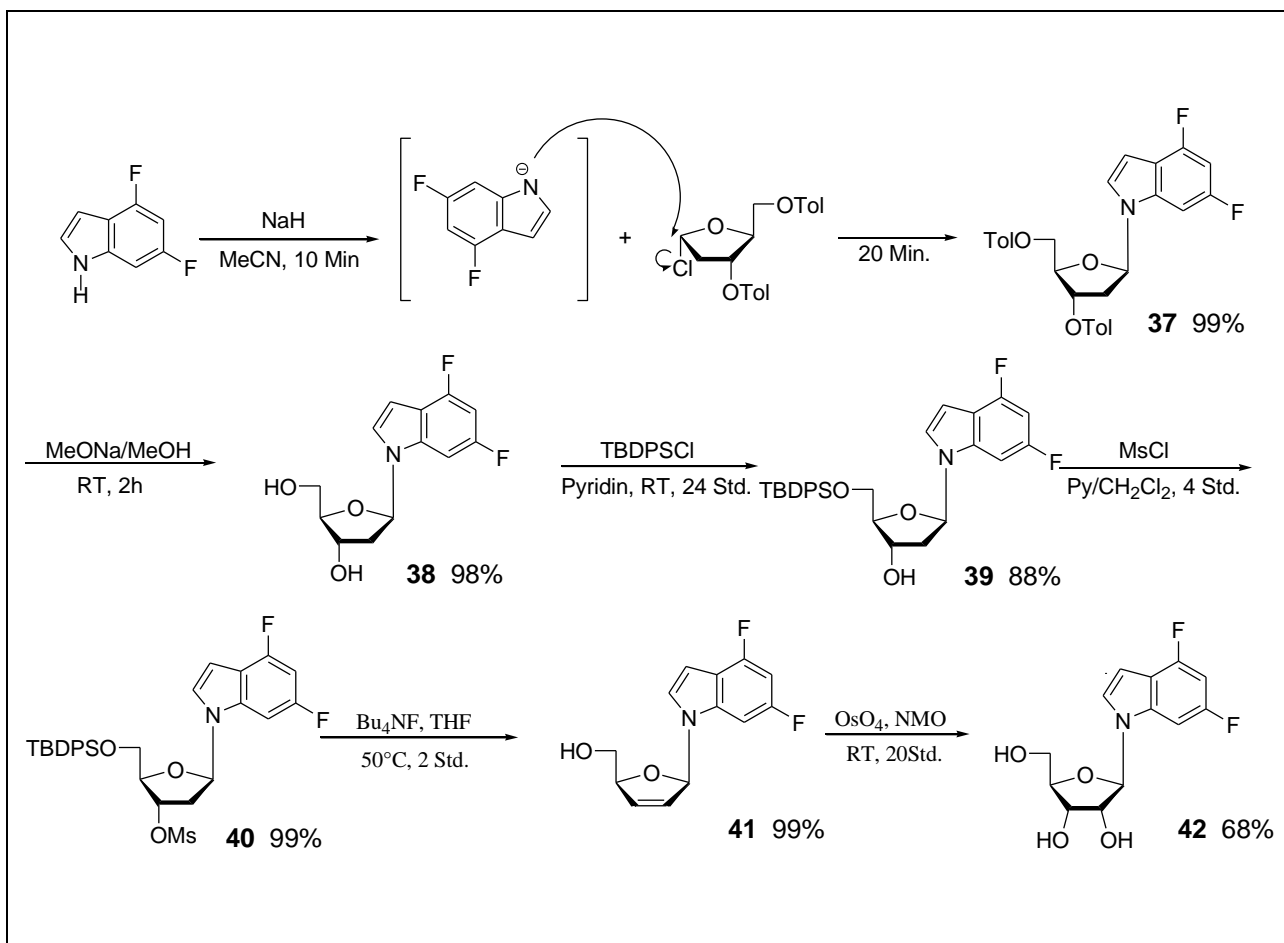


Abbildung 4.9.: Synthese von 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluorindolyl)- β -D-ribofuranose **42** mit mechanistischer Darstellung der Glycosylierungsreaktion

Durch die Reaktionsführung bedingt können keine α -Nukleoside entstehen. Dazu wurden ROESY-NMR Spektren aufgenommen. Zur Bestätigung der β -Nukleoside wurde die räumliche Nähe zwischen dem Proton an C1' und dem Proton an C4' identifiziert. Im Fall des α -Nukleosides sollten somit keine ROE-Signale zwischen diesen Protonen zu messen sein. Abbildung 4.10. zeigt einen Ausschnitt aus den ROESY-NMR Spektren von 1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7-fluorindol.

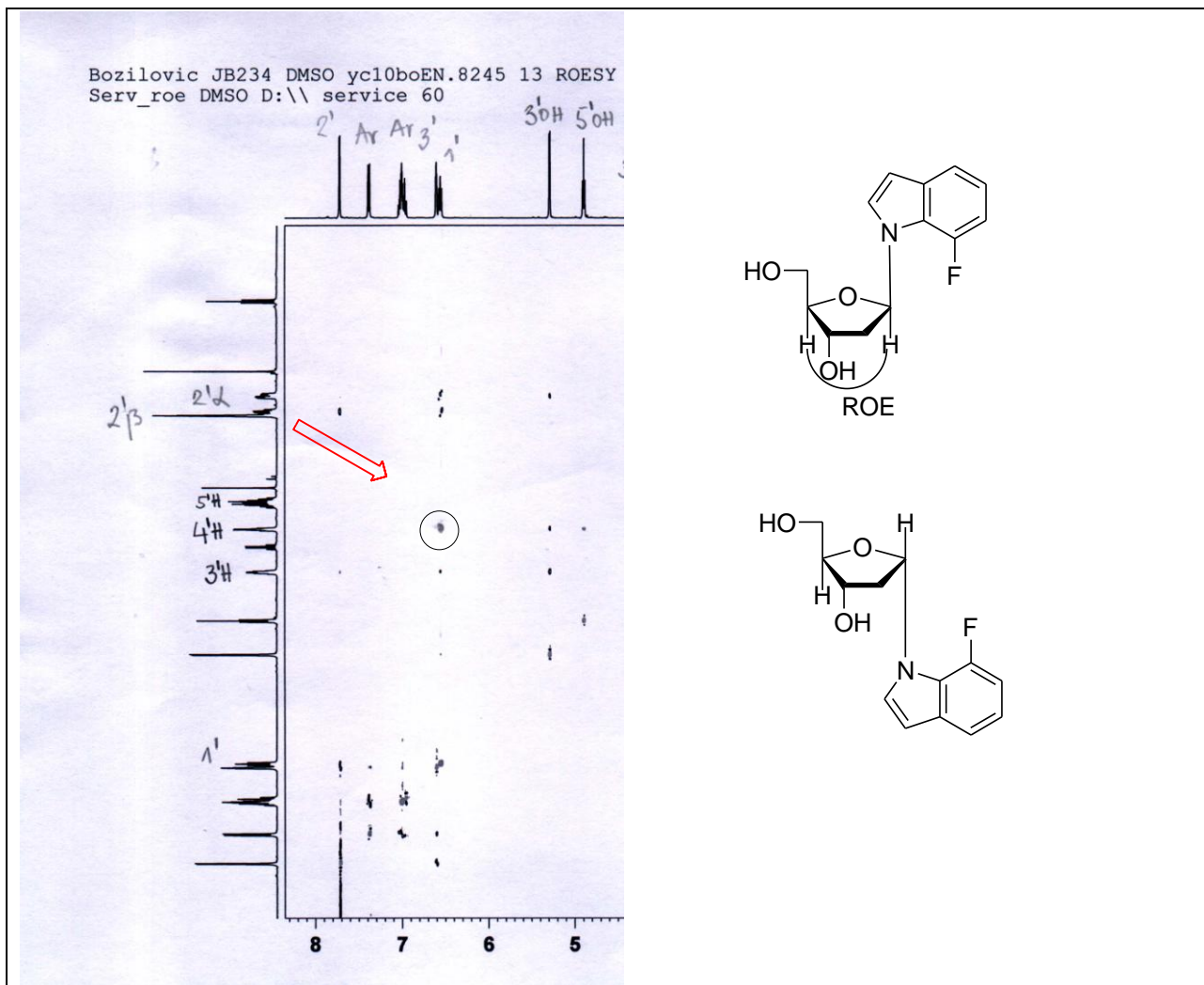
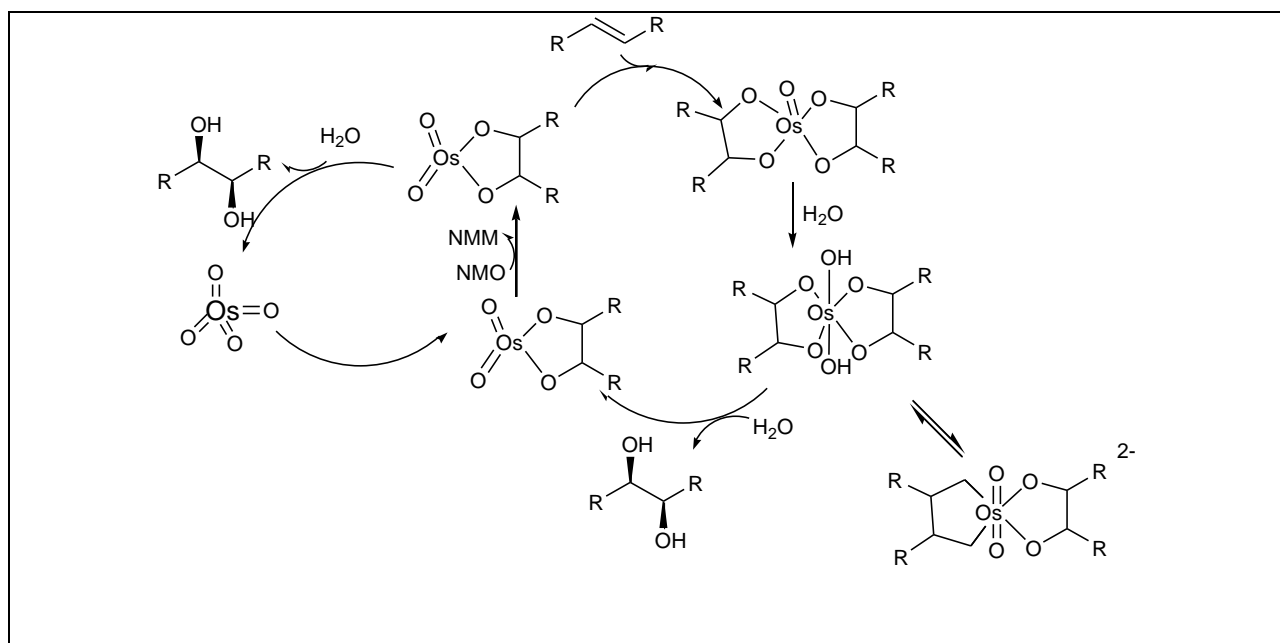


Abbildung 4.10.: Ausschnitt eines 400 MHz ROESY-NMR-Spektrums von 1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7-fluorindol

Die selektive Schützung der 5'-Hydroxigruppe erfolgt mit TBDPSCI in hohen Ausbeuten (**39**). Die Mesylierung der 3'-Hydroxigruppe liefert das komplett geschützte Nukleosid (**40**) in quantitativer Ausbeute. Mittels *tetra*-Butylamoniumfluorid erfolgt die Entschützung

von 5'- und Eliminierung der 3'-Gruppe in einem Reaktionsschritt (Abbildung 4.9 **41**). Mit Osmiumtetroxyd als Katalysator wird die Doppelbindung in Anwesenheit von *N*-Methylmorpholin-4-oxid und Wasser- dioxidiert (**42**). Die Mechanistische Darstellung der Dihydroxylierungsreaktion befindet sich in Abbildung 4.11. Die Gesamtausbeute der erhaltenen Nukleoside variiert zwischen 45 und 70%.



4.11.: Mechanistische Darstellung der Dihydroxylierungsreaktion mit OsO₄

Alle synthetisierten Nukleoside wurden auch als Ribonukleoside durch Kristallstrukturanalyse nachgewiesen. Die Kristallstruktur des 6-Fluorindol-Nukleosids befindet sich in Abbildung 4.12.

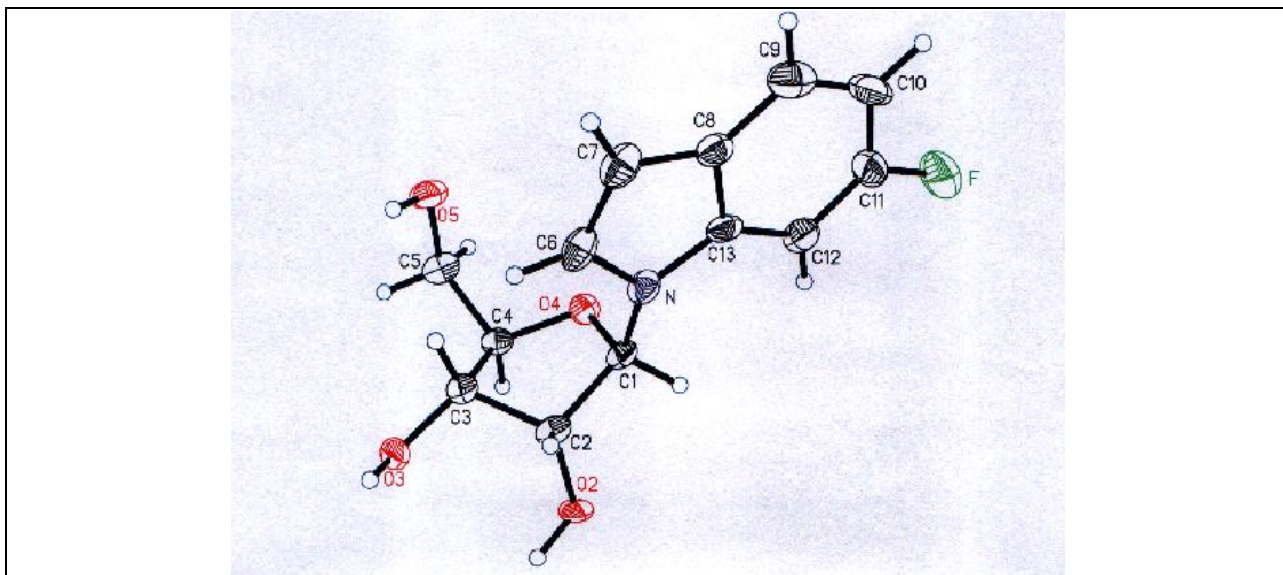


Abbildung 4.12.: Kristallstruktur von 6-Fluorindol-Nukleosid

4.2.1.b Glycosilierung von 7-N-Purin

Die Glycosilierungsreaktion zum Nukleosid wurde nach der Methode von H. Vorbrüggen durchgeführt (Vorbrüggen, 1981a). Diese für Purine und Benzimidazole geeignete Nukleosidsynthese liefert unter Friedel-Krafts-Katalyse β -N1-verknüpfte Nukleoside in hohen Ausbeuten. Basierend auf der Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion wird bei der Vorbrüggen- Glycosilierung ein peracetylierter Zucker **44** mit einer Nukleobase in Acetonitril in Anwesenheit eines schwachen Friedel-Krafts-Katalysators oder einer Lewisäure wie z.B. (Trimethylsilyl)trifluormethansulfonat umgesetzt. Hierbei finden drei Prozesse statt:

- die Bildung eines elektrophilen Zuckerkations **45** unter Nachbargruppenbeteiligung
- die Silylierung der Nucleobase mit N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), idealerweise unter Bevorzugung der Position N1
- die Reaktion zum Nukleosid unter Beteiligung der beiden Komponenten

Die Reaktion verläuft unter thermodynamischer Kontrolle und liefert reine β -Nukleoside, da die silylierte Nukleobase nur von einer Seite die Zuckerebene angreifen kann (Abbildung 4.13). Das intermediäre Zuckerkation **45** entsteht durch Abspaltung eines Trimethylsilylacetylesters. Der protonierte Fünfring steht dann in der α -Position an der

Ribose. Die Silylierung der Nukleobase **43**, welche die Löslichkeit des Purins **43** in Acetonitril deutlich erhöht, liefert aufgrund der Delokalisation des N-Wasserstoffs zwei Intermediate: Die gewünschte N7-silylierte Nukleobase und das N9-Isomer. Folglich erhält man nach Umsetzung mit dem Zuckerkation **45** ein Produktgemisch aus 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-N-purinyl)- β -D-ribofuranose **46** und 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(9-N-purinyl)- β -D-ribofuranose **47**.

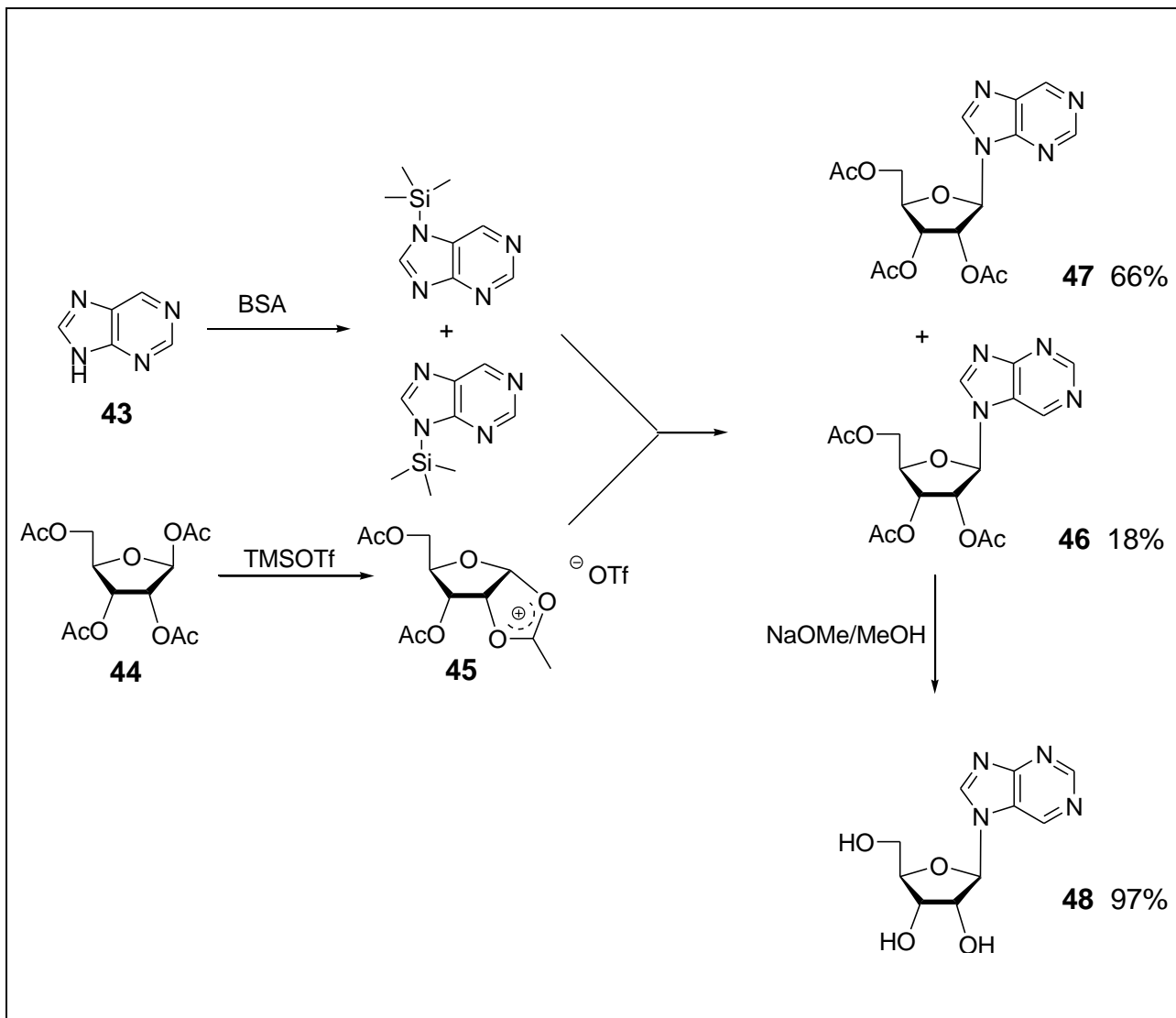


Abbildung 4.13.: Synthese von 1'-Desoxy-1'-(7-N-purinyl)- β -D-ribofuranose **48** mit mechanistischer Darstellung der Glycosilierungsreaktion nach Vorbrüggen

Das Produktverhältnis im aufgeführten Beispiel beträgt 1:3,7. Die Unterscheidung der beiden Isomere war mittels 2D-NMR-Spektroskopie möglich. In ROESY-Experimenten

konnte für das gewünschte Isomer **46** ein intensiver Kreuzpeak H1' und H6 und eine schwache Kupplung zwischen H5' und H6. Die Aufnahme des Spektrums der Verbindung **47** zeigte diese Kupplungen nicht.

Für die Deacetylierung von 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-N-puriny)- β -D-ribofuranose **46** bieten sich zwei chemische Varianten an: Zum einen die Abspaltung der Schutzgruppe unter milden basischen Bedingungen durch 20-stündiges Rühren in ammoniakalischem Methanol (Neilson, 1971). Ammoniakalisches Methanol kann durch Einleiten von NH₃ in MeOH bei -20°C hergestellt werden und ist bei dieser Temperatur lagerbar. Die Reaktion verläuft in guten Ausbeuten. Das während der Reaktion entstehende Acetamid ist jedoch relativ schwer abtrennbar und führt bei der Auftrennung zu Ausbeuteverlusten. Aus diesem Grund wie auch wegen der langen Reaktionszeit wurde auf die klassische Entschützung durch katalytische Mengen von Natrium-Methanolat zurückgegriffen. Die Reaktion erfolgt in absolutem Methanol bei Raumtemperatur und ist nach Zutropfen des Methanolats bei einstündigem Rühren beendet. Die Aufreinigung des entschützten Nukleosids 1'-Desoxy-1'-(7-N-puriny)- β -D-ribofuranose **48** erfolgt über eine Säulenchromatographie.

4.3 Synthese der RNA-Bausteine

Zur Synthese eines in der RNA-Festphasensynthese kupplungsfähigen Bausteines müssen zunächst die 5'- und die 2'-Hydroxygruppen orthogonal geschützt werden. Anschließend erfolgt die Phosphitylierung zum Phosphoramidit.

4.3.1 Dimethoxytritylierung der 5' OH-Funktion

Als Standardschutzgruppe in der Nukleosidchemie für die 5'-Position hat sich die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe etabliert. Diese kann in guten Ausbeuten eingeführt werden und während der Oligonucleotid-Festphasensynthese schnell und effizient mit Trichloressigsäure (TCA) abgespalten werden. Dabei wird die Menge an abgespaltenem Tritylkation detektiert und zur Verfolgung der Kupplungsausbeute und -effizienz herangezogen.

Die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylgruppe wird bei Raumtemperatur in Pyridin und Triethylamin eingeführt (Abbildung 4.14; Smith, 1962; Schaller, 1963). Aufgrund der hohen Reaktivität des primären 5'-Alkohols erfolgt die Reaktion selektiv an dieser Position. Das bei der Reaktion entstehende HCl wird durch den Überschuss an Pyridin abgepuffert. Alle Nukleoside konnten in sehr guten Ausbeuten hergestellt werden.

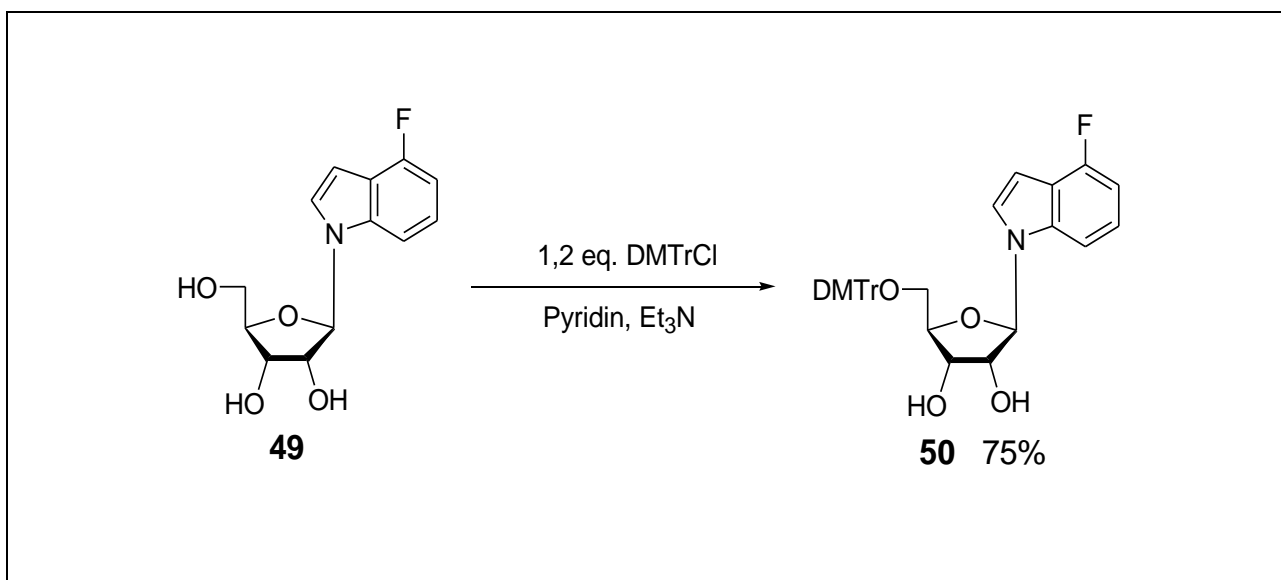


Abb4.14: Synthese der tritylierten Verbindung **50**

4.3.2 Die TBDMS-Schutzgruppe

Zur Protektion der 2'-Hydroxygruppe während der RNA-Festphasensynthese werden i.a. Silylschutzgruppen verwendet (Ogilvie, 1974a & 1978b). Diese können nach erfolgter Oligoribonukleotidsynthese mit Fluoridionen abgespalten werden (zur RNA-Festphasensynthese und der Aufreinigung von Oligonukleotiden (siehe Kapitel 6 und 11). In den letzten Jahren hat sich die tert.-Butyldimethylsilyl(TBDMS)-Gruppe als Standard in der Phosphoramiditchemie durchgesetzt.

Zur Synthese 2'-TBDMS-geschützter Nukleoside werden die 5'-geschützten Nukleoside in einer 1:1-Mischung aus Pyridin und THF gelöst und mit *tert.*-Butyldimethylchlorsilan

(1M Lösung in THF) versetzt (Abbildung 4.15). Dabei entsteht immer ein Gemisch aus dem 2'- und 3'-Regioisomer. Der Zusatz von Silbernitrat bewirkt eine Steigerung des Anteils an 2'-O-tert.-Butyldimethylsilyl-substituiertem Produkt (Hakimelahi, 1982). Zudem ermöglicht das *cis*-Diol-System der Ribose eine Wanderung der Schutzgruppe von der 2'-Position zur thermodynamisch günstigeren 3'-Position (Jones & Reese, 1979). Dies wird vor allem in polaren Lösungsmitteln beobachtet und trägt zu deutlichen Ausbeuteverlusten bei.

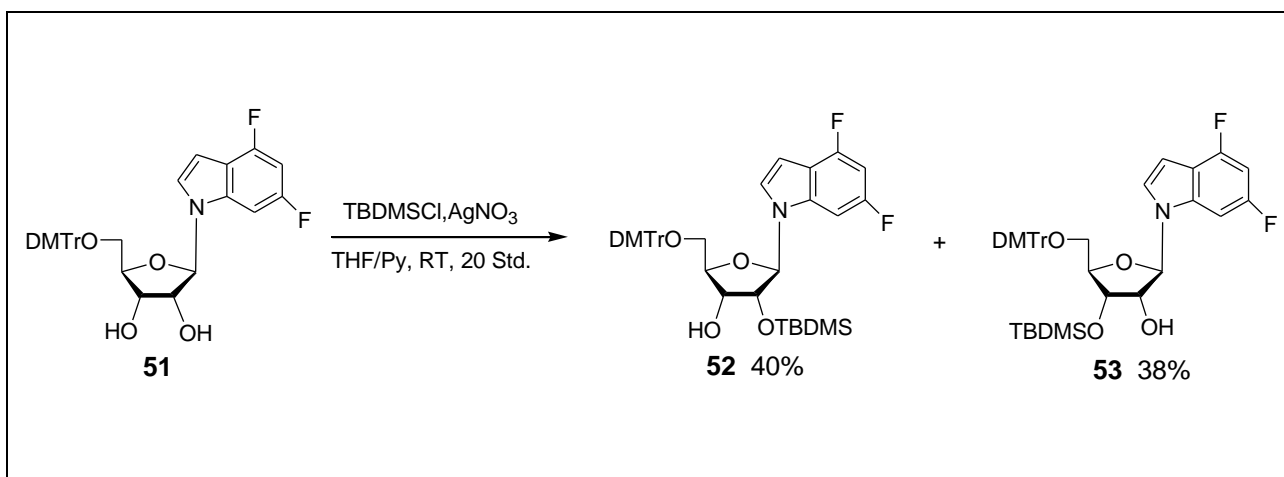


Abbildung 4.15: Einführung der TBDMS-Schutzgruppe

Die Trennung der 2'- und 3'-Regioisomeren war in alle Fällen nur über präparative HPLC möglich. Die Charakterisierung und Unterscheidung der Isomeren erfolgte durch ¹H,¹H-COSY-NMR-Spektroskopie.

4.3.3 Phosphitylierung

Die Umsetzung des 5'- und 2'-geschützten Nukleosids **52**, zu kupplungsfähigem Monomeren, das in der RNA-Festphasensynthese eingesetzt werden kann, erfolgt mit 2-Cyanethyldiisopropylchlorphosphoramidit. Dieses kann in zwei Substitutionsreaktionen aus PCl₃, 3-Hydroxypropionitril und Diisopropylamin hergestellt werden (Sinha, 1983). Zur Synthese des nukleosidischen Phosphoramidits **54** (Abbildung 4.16) wurden die Verbindungen in Acetonitril gelöst, mit Collidin und N-Methylimidazol als Aktivator versetzt und auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe des Phosphitylierers wurde zunächst im

Eisbad und anschließend bei Raumtemperatur gerührt. Um die Bildung von H-Phosphonaten zu vermeiden, ist darauf zu achten, dass nur kurze Zeit bei Raumtemperatur gerührt wird.

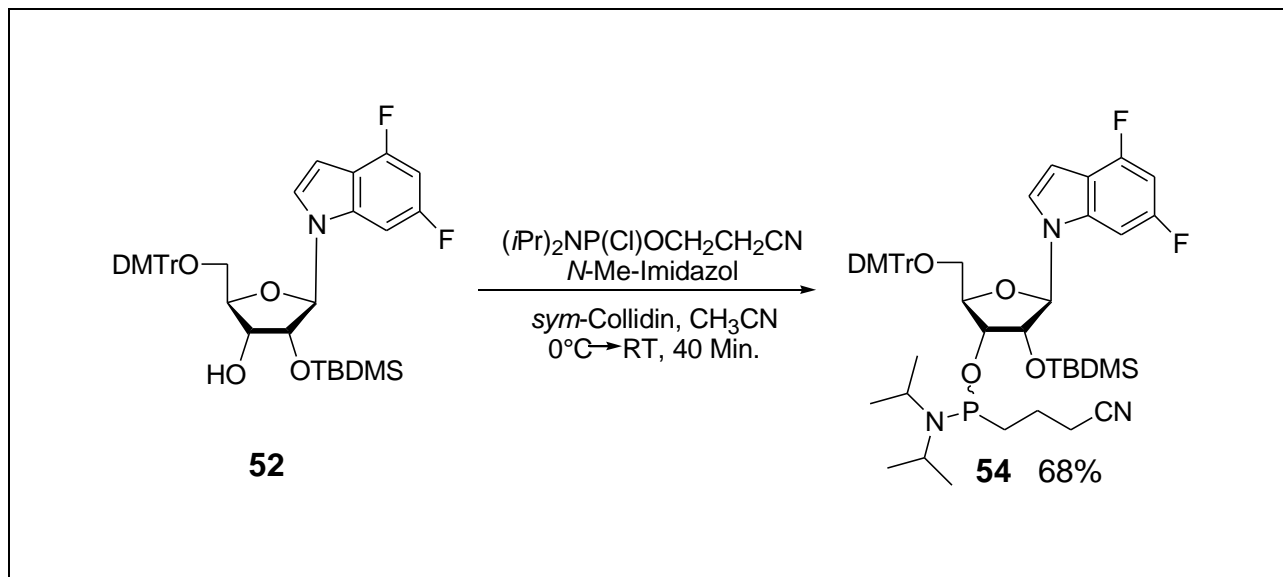


Abb. 4.16.: Synthese der Phosphoramidit **54**

Bei der Isolierung des Reaktionsproduktes ist zur Abtrennung des sym. Collidins mit chromatographischen Methoden oft ein zweiter Trennschritt notwendig. Wird bei der Aufarbeitung die organische Phase jedoch mit 0,01M Zitronensäure ausgeschüttelt, geht das Collidin durch Protonierung direkt in die wässrige Phase über (Wozninak, 1997). Die Dimethoxytrityl-Schutzgruppe ist unter diesen Bedingungen stabil und man erhält bereits vor der säulenchromatographischen Trennung ein relativ sauberes Rohprodukt. Das gewünschte Phosphoramidit kann dann mit einer kurzen Chromatographie-Säule schnell und effizient isoliert werden.

Bei der Reaktion entstehen als Produkt zwei Diastereomere, welche bei der Aufreinigung über präparative Dünnschichtchromatographie nicht getrennt werden müssen. Beide Isomere können in der Festphasensynthese eingesetzt werden. Das TBDMS-geschützte Phosphoramidit **54** konnte in einer Ausbeute von 68% hergestellt werden. Die Charakterisierung der Phosphoramidite erfolgte sowohl über ^1H -NMR-Spektroskopie und ESI-Massenspektrometrie als auch über ^{31}P -NMR (Abbildung 4.17 und Abbildung 4.18)

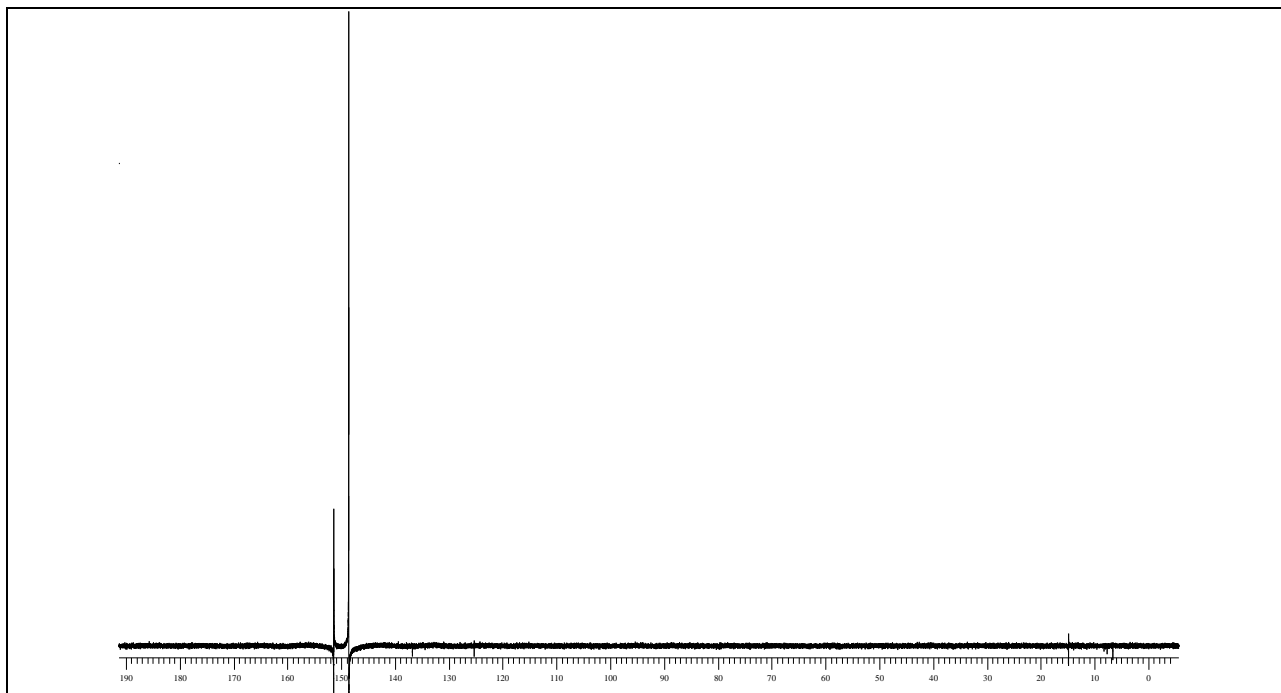


Abb.4.17: ^{31}P -NMR-Spektrum von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-tert.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - 5-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose **57**

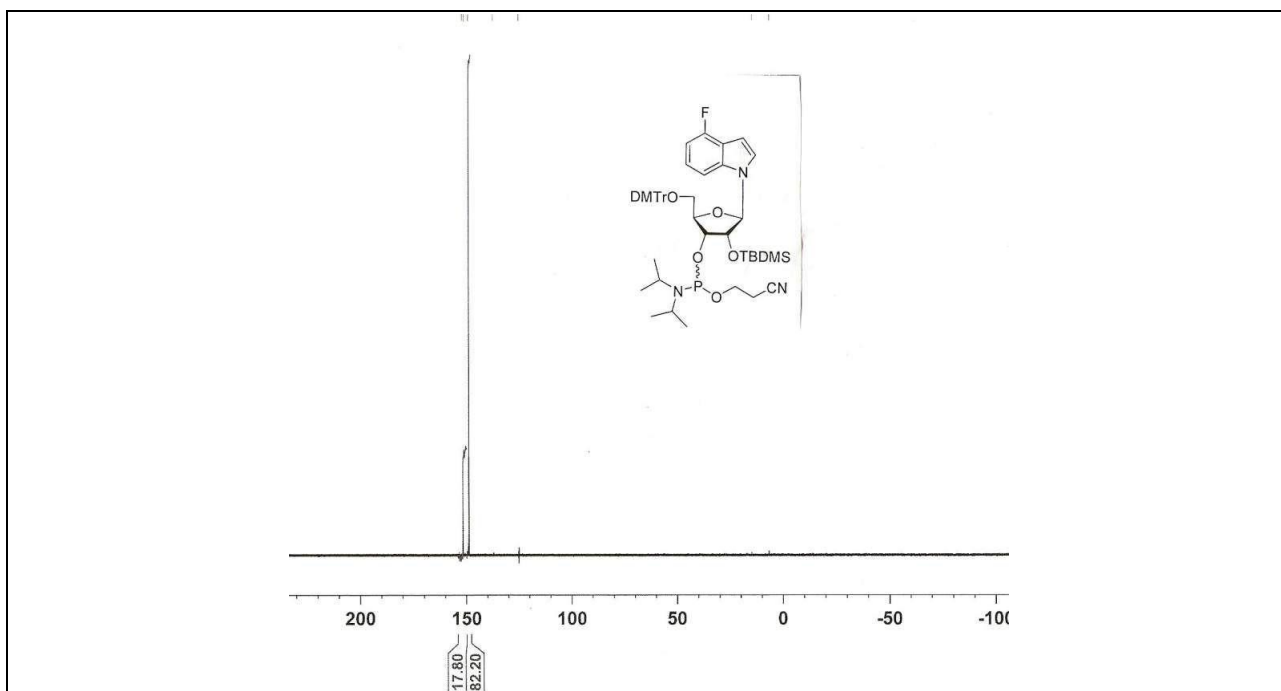
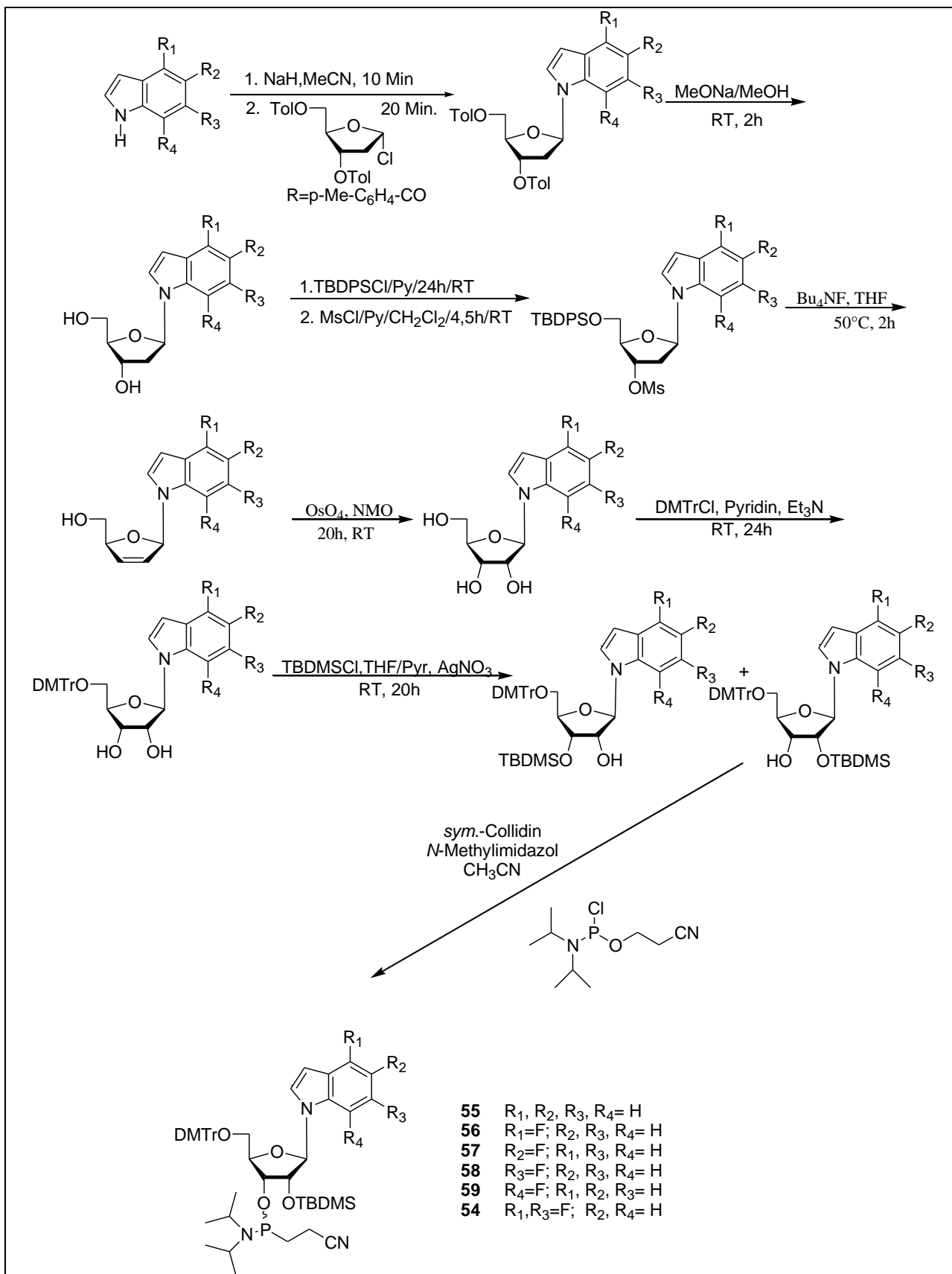
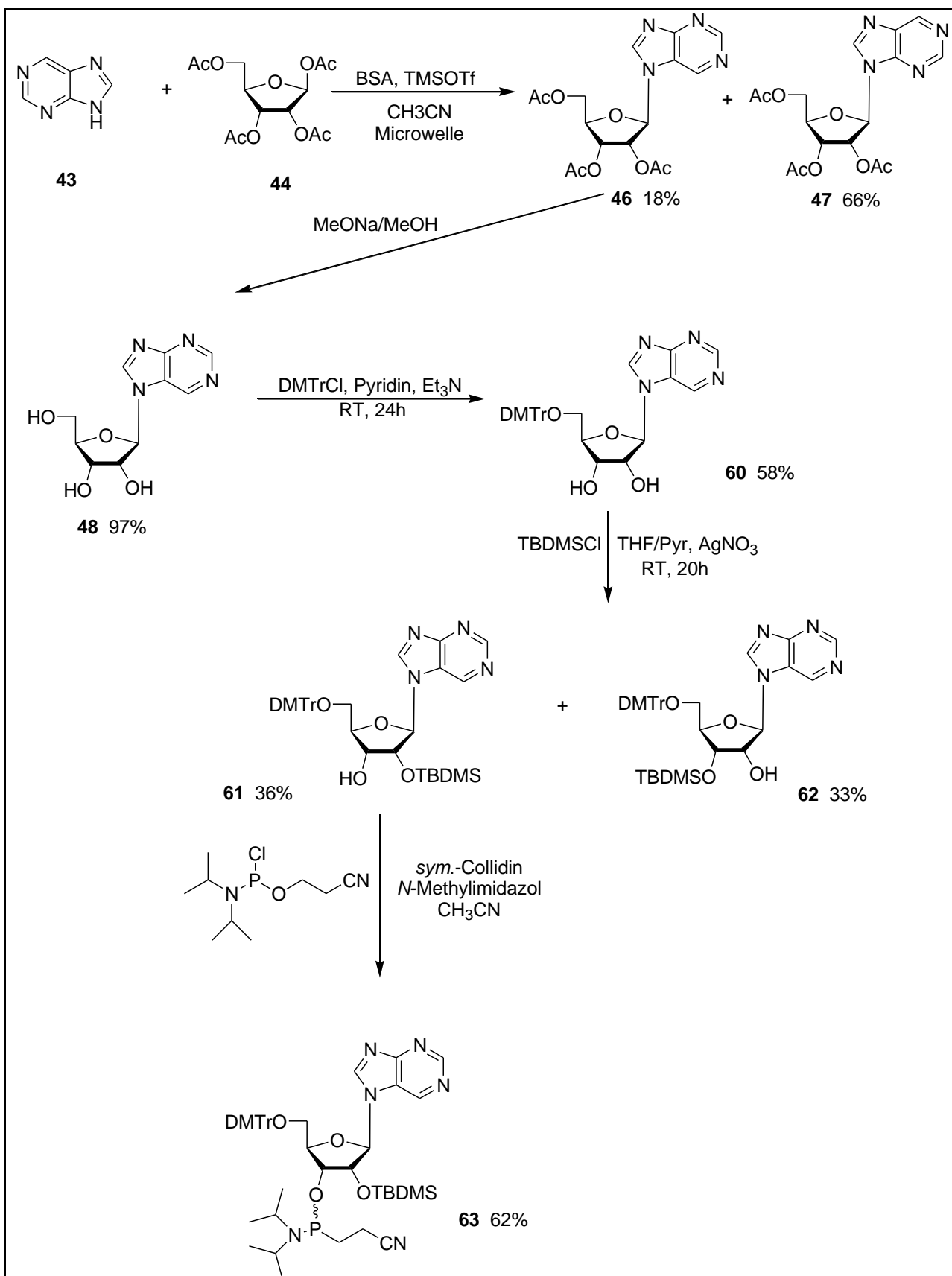


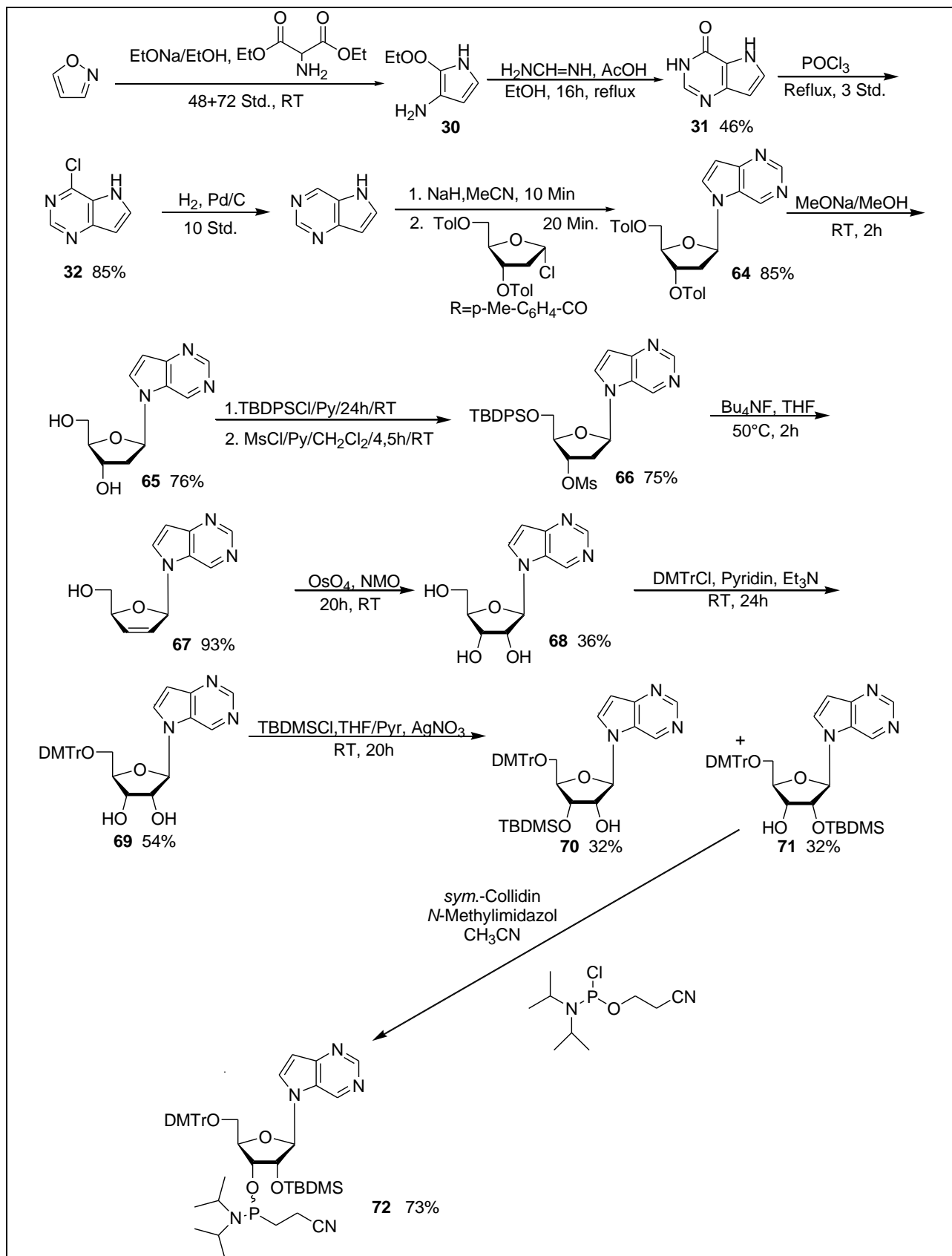
Abb.4.18: ^{31}P -NMR-Spektrum von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3'-O-tert.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (4-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose **56**

4.4 Syntheseübersicht

Zur besseren Übersicht der in Kapitel 4 vorgestellten Synthesen ist in Abbildung 4.19 der Syntheseweg zu den Indol-Amiditen 54-59 Abbildung 4.20 beschreibt die Darstellung des 7-N-Purin-Amidit und die Abbildung 4.21 die Darstellung des 9-Deazapurin-Amidit.

Abbildung 4.19: Synthese der Phosphoramidite **54-59**

Abbildung 4.20: Synthese des 7-N-Purin Phosphoramidits **63**

Abbildung 4.21: Synthese des 9-Deazapurin Phosphoramidits **61**

4.5 Abasischer Baustein

Für umfassende Untersuchungen zu Basenstapelungswechselwirkungen gehört ein Vergleich der zu untersuchenden Verbindungen mit einem abasischen Baustein. Ein abasischer Baustein trägt keine Nukleobase und kann somit nicht durch Basenstapelungswechselwirkungen zur Stabilität einer Doppelhelix beitragen.

Ausgehend von D-Ribose wurde erst 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranose synthetisiert. Um einen abasischen Baustein zu erhalten, muss die Hydroxylgruppe an C1 entfernt werden. Dazu wurde Ausgangsprodukt **73** in Acetonitril gelöst und mit Bortrifluorid-Ethyletherat und Triethylsilan versetzt (Purdy *et al.*, 1994). Nach einer Reaktionszeit von 1,5 Stunden ist die Reaktion beendet. Im Gegensatz zu den Dehydroxylierungen der C-Nukleoside wird die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Aufarbeitung erhält man 2,3,5-Tri-O-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose **74** in 88,4 %iger Ausbeute.

Die Abspaltung der Schutzgruppen verlief in Ethanol/Cyclohexen-Lösung mit Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle (Hossain *et al.*, 1998) in guten Ausbeuten. Bei der Reaktion handelt es sich wie bei den C-Nukleosiden um eine Transfer-Hydrogenolyse, bei der Cyclohexen als Wasserstoff-Donor fungiert (Hanessian *et al.*, 1981). Nach vier Stunden sieden unter Rückfluß sind alle drei Benzyl-Schutzgruppen abgespalten und 1-Desoxy-D-ribofuranose **75** wird mit 95,3 %iger Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten. Die folgenden Syntheseschritte zum Amidit sind den der anderen bisher beschriebenen Amiditbausteine ähnlich. Zuerst wird die 5'-Hydroxylfunktion mit Dimethoxytriphenylmethylchlorid geschützt. Die anschließende Schützung mit TBDMSCl in Pyridin/THF in Gegenwart von Silbernitrat liefert wie erwartet ein Isomerengemisch aus an 2- bzw. 3-Position geschütztem Zucker. Im Gegensatz zu allen anderen bisher beschriebenen Benzol- und Benzimidazol-Nukleosiden zeigen beide TBDMS geschützten Isomere des abasischen Bausteins keine Wanderungstendenz der TBDMS Schutzgruppe. Aus diesem Grund kann anhand der Ausbeuten der Einfluss des Silbernitrates auf die Größenordnung des Isomerenverhältnisses gezeigt werden. Das für die weitere Synthese benötigte 2-TBDMS geschützte Isomer **78** entsteht 2,2-fach häufiger als das 3-TBDMS geschützte Isomer **77** (60,3 % zu 27,3 %).

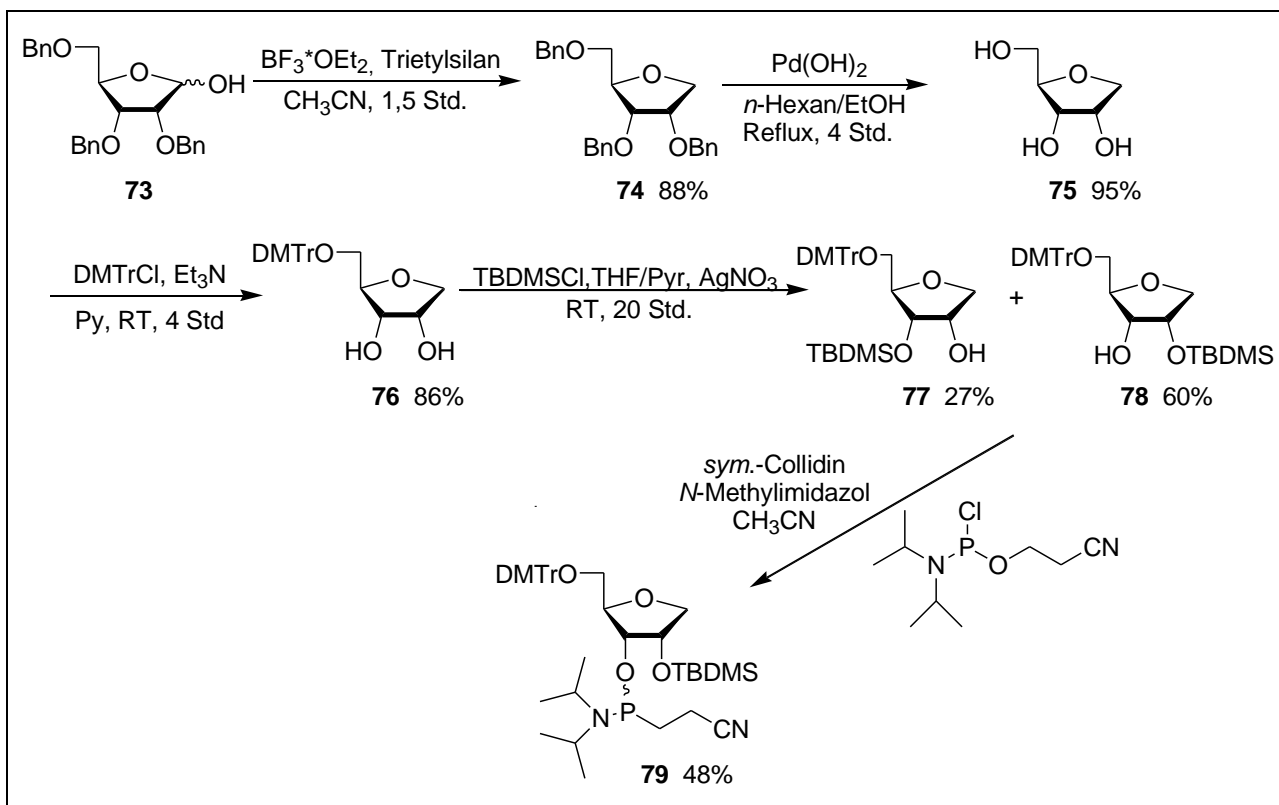


Abbildung 4.22: Syntheseübersicht für 3-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-5-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2-O-tert.-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribo-furanose **79**

Die Phosphitylierung von 5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **78** liefert unter klassische Bedingungen, das gewünschte Produkt **79** mit einer Ausbeute von 47,8 % (Abbildung 4.22).

5 Kristallstrukturanalysen

Ein Kristall ist ein geordnetes, supramolekulares System und entsprechend Dunitz „a supramolecular par excellence“ (Dunitz, 1996) Die Röntgen Einkristallstrukturanalyse liefert genaue Informationen über die Strukturen von molekularen Komplexen und die Nichtbindenden Wechselwirkungen zwischen den Atomen im festen Zustand. Diese Technik hat sich zur bedeutendsten in der Strukturaufklärung entwickelt.

Alle Datenbanken, die Informationen über Kristallstrukturen erhalten, sind exponential gewachsen und werden genutzt, um Informationen über chemische Wechselwirkungen zu erhalten.

Die sind die Grundlagen für die intensive Untersuchung klassischer H-bindungen und in letzten Zeit werden sie genutzt, um schwächere H-Bindungen, beispielsweise C-H...O, C-H...N, C-H...Cl, zu untersuchen und aktuell werden C-H...F-C Wasserstoffbrücken betrachtet. Die Richtung, die Energien, die Entfernung relativ zu den van der Waals Radien und Bindungslängen sind nützliche Kriterien, um H-Brücken zu klassifizieren. In diesem Zusammenhang sind C-H/ π Wechselwirkungen als Wasserstoffbrücken definiert worden.

Es können Parallelen zwischen der Strukturaufklärung aus Modellsystemen in flüssiger Phase und denen, die die Supramolekulare Natur eines molekularen Netzwerks im festen Zustand definieren, gezogen werden.

5.1 Bragg-Gleichung

Röntgenstrahlung entsteht, wenn in einem Atom die inneren Elektronen ihre Bahn um den Kern ändern und dabei Energie abgeben, oder wenn schnelle Elektronen um die Kurve fliegen oder abrupt gebremst werden. Wilhelm Conrad Röntgen entdeckte

im Jahr 1895 zufällig eine neue Art von Strahlung. Er wusste nicht, welcher Natur sie war und nannte sie X-Strahlung.

Trifft Röntgenstrahlung auf einen Kristall, so wird dieser von einem Großteil der Strahlung ungehindert durchdrungen. Allerdings wird auch beobachtet, dass Strahlungsanteile durch den Kristall zum Teil erheblich abgelenkt werden, ein Phänomen, das man als Röntgenbeugung bezeichnet. Montiert man hinter dem Kristall eine Fotoplatte, um die abgelenkten Strahlungsanteile sichtbar zu machen, erhält man darauf charakteristische Muster. Ursache hierfür ist nach einer klassischen Vorstellung die Reflexion oder Beugung von Röntgenstrahlung an Schichten innerhalb des Kristalls, die sich wie halbdurchlässige Spiegel (Abbildung 5.1) verhalten, so genannten Netz- oder Gitterebenen.

Nur wenn die Bragg Gleichung erfüllt ist, dann wird die maximale Intensität vom Kristall gebeugt (Bragg&Bragg, 1913).

$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

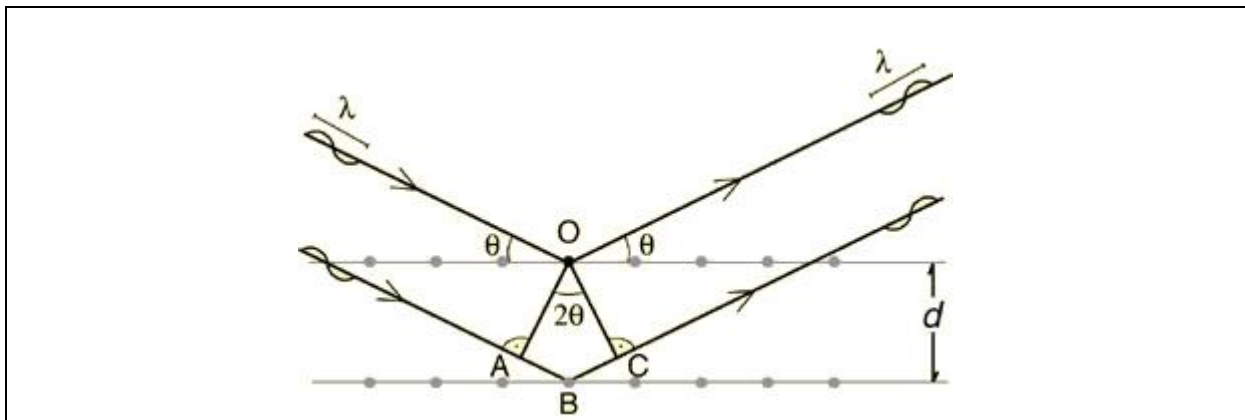


Abbildung 5.1.: Braggsche Reflexionsbedingung

λ -Wellenlänge

d -Netzebenenabstand

θ -Glanzwinkel

n -ganze Zahl

5.2 Kristallstrukturanalysen der Nukleosidanaloga

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen von allen Fluorindol-Nukleosiden und von 7-*N*-Purin-Nukleosid Einkristalle und daraus Kristallstrukturen zu erhalten. Die Kristalle wurden aus Wasser oder aus einer Mischung aus Methanol und Wasser bei Raumtemperatur oder bei 4°C erhalten. Die vollständigen Datensätze der Röntgenstrukturanalysen befinden sich in Anhang Teil A. Alle Kristalldaten sind in Tabelle 5.1. gezeigt.

Nukleosid	kristallisiert aus	Temperatur [°C]	Kristallsystem	Raumgruppe	Zucker- konformation
4FI	Methanol/Wasser	4°C	monoklin	P ₂₁	zwischen C2'-endo C3'-exo
5FI	Methanol	4°C	orthorombisch	P ₂₁₂₁₂₁	zwischen C2'-endo C3'-exo
6FI	Methanol	4°C	orthorombisch	P ₂₁₂₁₂₁	zwischen C2'-endo C3'-exo
7FI	Methanol	4°C	monoklin	C2	zwischen C2'-endo C3'-exo
4,6DFI	Methanol	4°C	orthorombisch	P ₂₁₂₁₂₁	C3'-endo
7NP	Methanol/Wasser	4°C	orthorombisch	P ₂₁₂₁₂₁	C2'-endo

Tabelle 5.1.: Kristalldaten des Nukleosidanaloga

Alle erhaltenen Kristalle sind entweder in einem orthorombischen oder in einem monoklinen Kristallsystem kristallisiert. Die Kristalle weisen immer eine hydrophile Schicht aus den Fluoraromaten auf.

Die F...H Abstände zwischen dem Fluoratom und einem Wasserstoffatom, welches sich in *ortho*-Position zu einem Fluoratom eines im Kristall gegenüberliegenden Moleküls befindet, variiert zwischen 2,30 Å bei 7FI und 2,69 Å bei 4FI. Die

gemessenen F...H Abstände sind deutlich kürzer als die Summe der van-der-Waals Radien von Fluor und Wasserstoff mit 2,55 Å, außer bei 4FI, wobei dieser Abstand 2,69 Å beträgt, somit kann von F...H Wechselwirkungen gesprochen werden. Bedingt durch die F...H Wasserstoffbrücke wird die Orientierung der Nukleoside zueinander verändert.

Kristallpackungen von aromatischen Systemen sollten eine Fischgräten-Struktur aufweisen. Die Kristallpackungen der Fluorphenyl-nukleoside und Fluorindolyl-nukleoside (Abbildung 5.2. a) weisen alle keine Fischgräten-Struktur auf. Durch die F...H Wasserstoffbrücke kommt es zu einer gegenüberliegenden Orientierung der Nukleoside (Abbildung 5.2. b). Die F...H Wasserstoffbrücken ziehen sich wie ein Netz durch den Kristall. Dies ist in Abbildung 5.2. verdeutlicht. Die gestrichelten Linien sollen dabei die Wasserstoffbrücken symbolisieren.

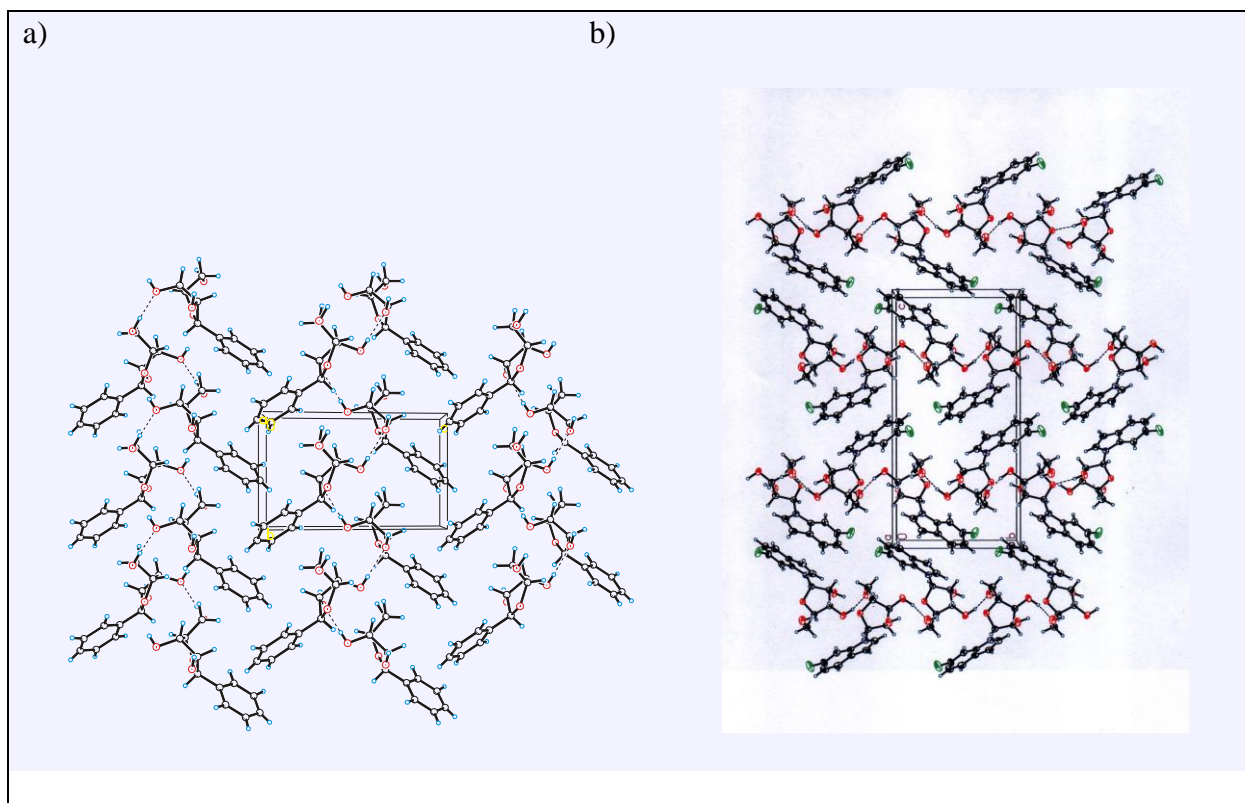


Abbildung 5.2.: a) Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-phenyl-β-D-ribofuranose b) Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-(6-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose

Die Orientierung der Nukleobasen zueinander ist aufgehoben. Stattdessen nehmen die Nukleobasen eine Orientierung ein, wie sie von Molekülen mit starken Basenstapelungswechselwirkungen bekannt ist.

Im Fall der Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose, kann man eine andere Kristallpackung erkennen. Diese Kristallpackung zeigt keine Base – Base Wechselwirkung, außer π - π Stacking. Die Moleküle sind so orientiert, dass die Base immer mit einer Zucker-Schicht verbunden ist (Abbildung 5.3). Das bedeutet, dass immer eine Zucker-Untereinheit bzw. eine aromatische Nukleobase eine Schicht bilden.

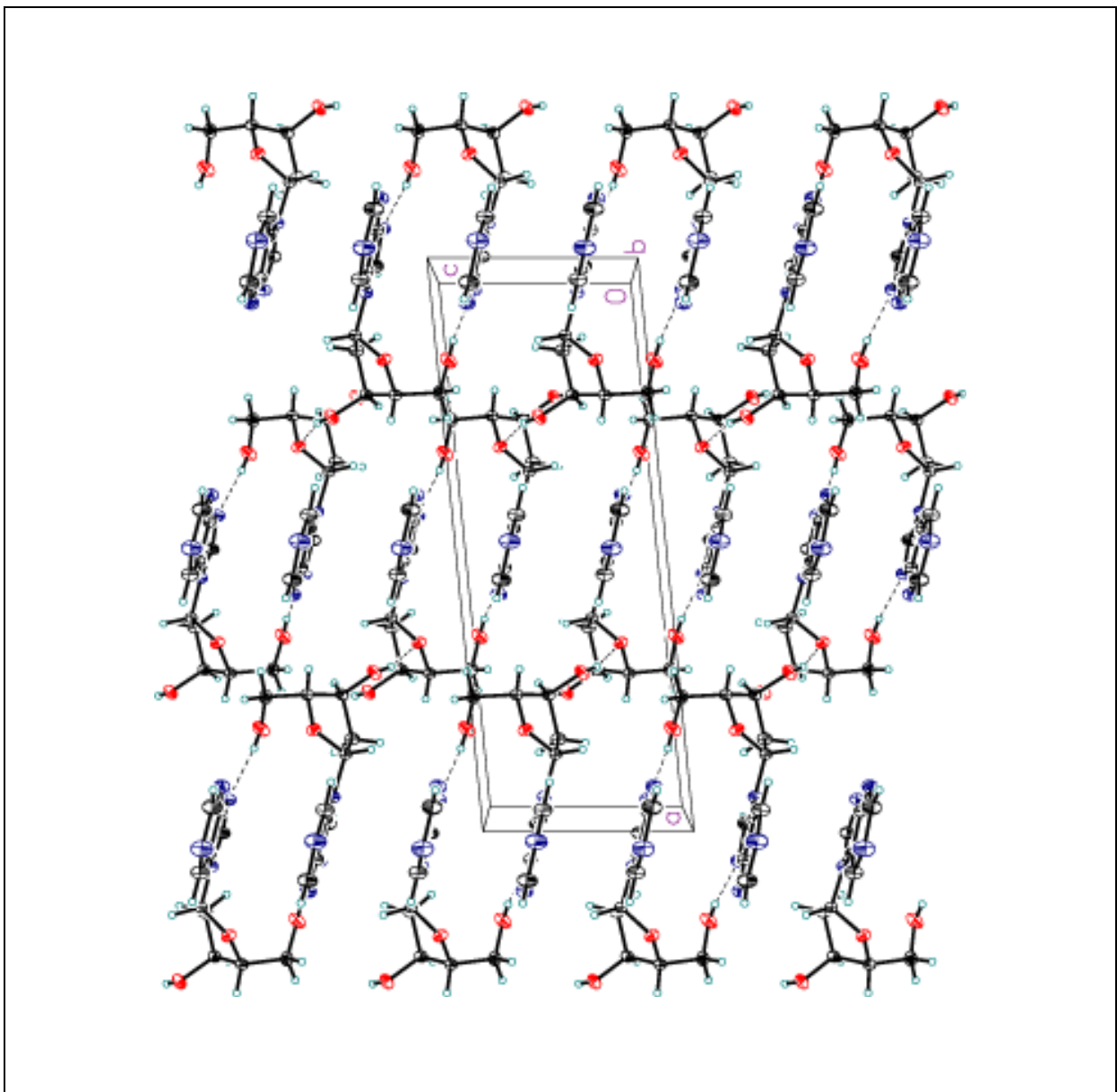


Abbildung 5.3.: Kristallpackung von 1'-Desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose

Zusammenfassend lässt sich über die erhaltenen Kristallstrukturen sagen, dass die Grundstruktur durch O...H Wasserstoffbrücken und den hydrophilen – lipophilen Aufbau der Nukleoside dominiert wird. Wenn Fluor durch seine Position an der

aromatischen Nukleobase aber in der Lage ist F...H Wasserstoffbrücken auszubilden, so sind diese doch stark genug, um die resultierende Kristallpackung fundamental zu verändern. Immer wenn Fluor eine Wasserstoffbrücke eingeht kommt es nicht zu der erwarteten Fischgräten-Struktur, sondern zu einer Orientierung der Nukleobasen zueinander. Die gemessenen F...H Wasserstoffbrücken gehören zu den stärksten ihrer Art, d.h. sie weisen mit die kürzesten bekannten F...H Abstände auf (außer bei 1'-Desoxy-1'-(4-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose. In Abbildung 5.4 ist das von Thalladi und Mitarbeitern (Thalladi *et al.*, 1998) gefundene Ergebnis einer Suche in der Cambridge Structural Database für F...H Abstände und Winkel von Wasserstoffbrücken des Typs $C_{sp^2}\cdots F\cdots H-C_{sp^2}$ zu sehen. Die in dieser Arbeit untersuchten Moleküle sind als rote Kreise in der Abbildung hinzugefügt.

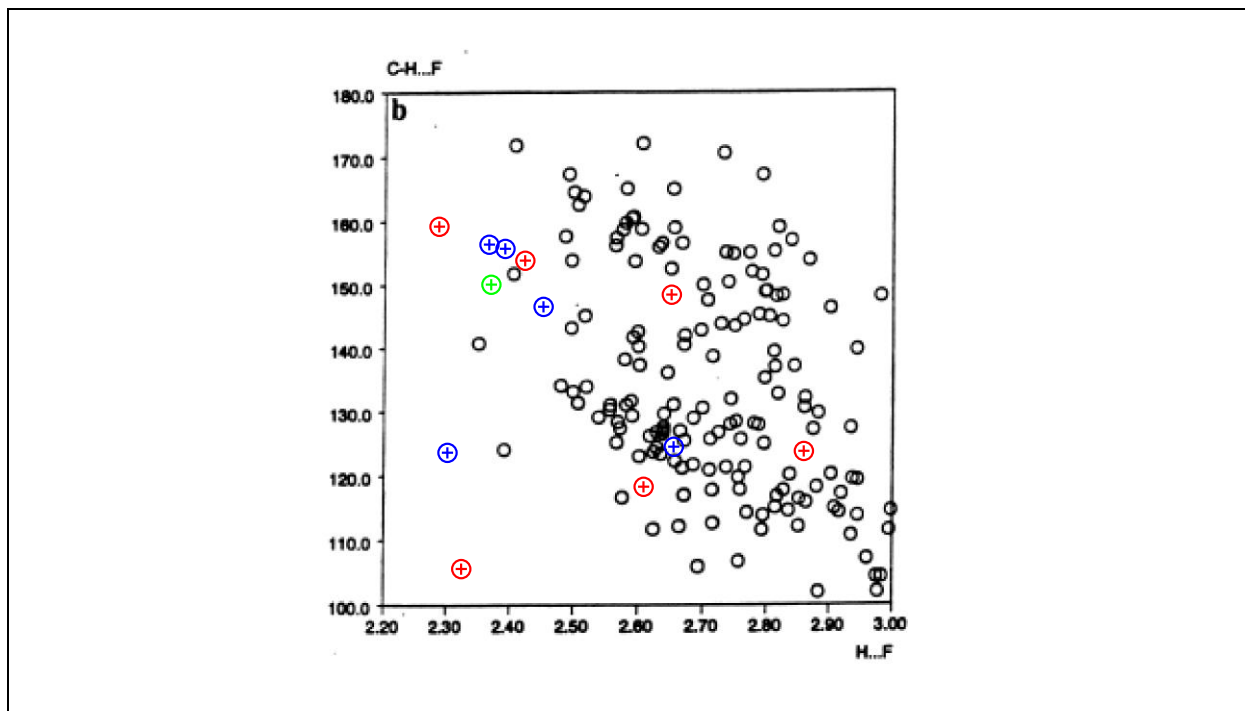


Abb. 5.4.: C-F...H Abstände und Winkel von Wasserstoffbrücken des Typs $C_{sp^2}\cdots F\cdots H-C_{sp^2}$ (Thalladi *et al.*, 1998) ergänzt mit den in Arbeit von Dr. Aleksandra Zivkovic (grün) und Dr. Jörg Parsch (rot) und von dieser Arbeit (blau) gefundenen Werten

Mit 230 pm ist der F...H Abstand bei 1'-Desoxy-1'-(4-fluorphenyl)- β -D-ribofuranose, kristallisiert aus Methanol bei 20°C, sogar der kürzeste bisher in der Literatur bekannte F...H Abstand des Typs $C_{sp^2}\cdots F\cdots H-C_{sp^2}$. Dieser Wert ist von Dr. Jörg Parsch

gemessen werden. Die gleiche Abstand, nur mit einem anderem Winkel zeigt 1'-Desoxy-1'-(7-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose.

6 Oligonukleotide

6.1 Synthese von Oligonukleotiden

Oligonukleotide sind langkettige Moleküle, die aus einer beliebigen Abfolge von Nukleotiden aufgebaut sind. Durch die Entwicklung der Oligonukleotid-Festphasensynthese wurde die rasche, routinemäßige Synthese von Oligonukleotiden ermöglicht. Der Aufbau von Oligonukleotiden aus Monomeren in beliebiger Sequenz war ein Meilenstein in der Geschichte der Nukleinsäurechemie und ermöglichte die Fortschritte auf dem Gebiet der therapeutische Oligonukleotide und der Biotechnologie im Allgemeinen. Die Grundlagen dafür wurden durch Diester-, Triester- und die H-Phosphonatmethode Mitte der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts gelegt (Letsinger, 1975; Letsinger, 1976). R. Letsinger konnte dabei auf die Ergebnisse von Merrifield zurückgreifen, der die Festphasensynthese für Polypeptide entwickelte (Merrifield, 1963). Die Synthese an der festen Phase bietet neben den hohen Ausbeuten an Oligonukleotid eine Reihe von Vorteilen: Neben der Automatisierbarkeit sind hohe Kupplungsausbeuten, einfache Spülschritte zur Entfernung überschüssiger Reagenzien und eine einmalige, effiziente Aufreinigung am Ende der gesamten Synthese zu nennen.

6.2 Die Phosphoramidit-Methode

Als Standardmethode zur Festphasensynthese von Oligonukleotiden hat sich jedoch die Phosphoramidit-Chemie durchgesetzt (Beaucage & Caruthers, 1981; Sinha et al., 1983, Caruthers, 1987).

Eine orthogonale Schutzgruppenstrategie ermöglicht die selektive Abspaltung bestimmter Gruppen während der Synthese und führt somit zu einer effizienten Kupplung der Phosphoramidite an die immobilisierten Nukleotide. Die Synthese wird auf Glaskügelchen mit definierter Porenweite (CPG, engl.: **controlled pore glass**; 500 oder 1000 Å Porengröße) als fester Phase durchgeführt. Diese polymere Matrix ist im verwendeten Lösungsmittel Acetonitril unlöslich und inert. Das erste Nukleosid ist über seine 3'-Hydroxygruppe mittels eines basenlabilen Linkers (z.B. Succinyllinker) mit der festen Phase verknüpft.

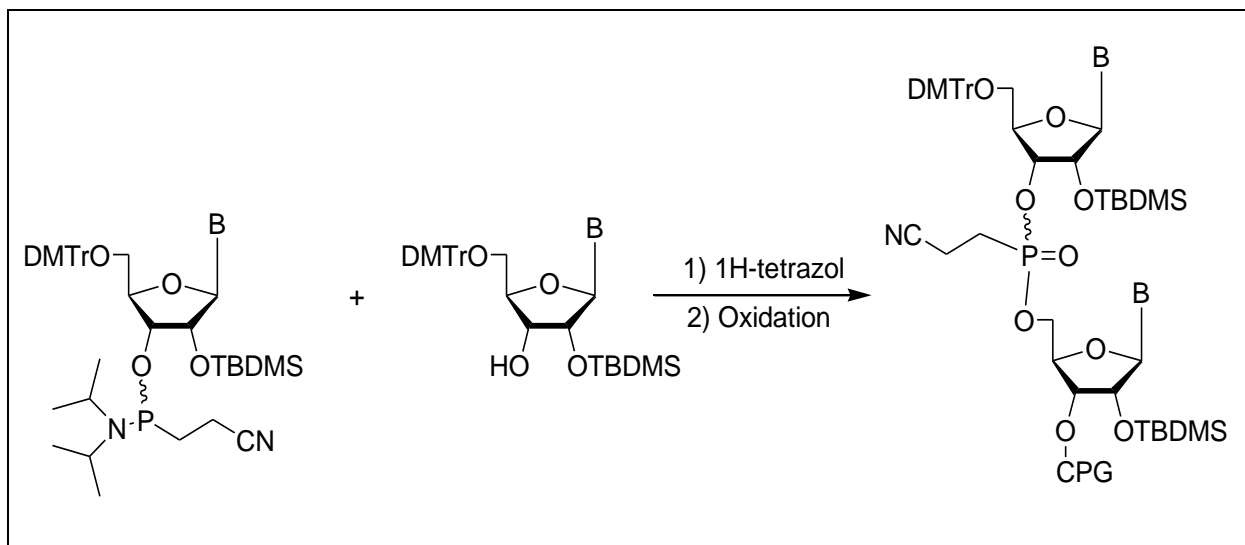


Abbildung 6.1: Phosphoramidit-Methode

Die Synthese erfolgt in 3' → 5'-Richtung. Der Zyklus wird durch die Entschützung der 5'-Hydroxylgruppe mit 3%iger Trichloressigsäure gestartet. Die nach jedem Kupplungsschritt durchgeführte Oxidation liefert den Phosphatriester (Abbildung 6.1). Durch die Aktivierung mit Tetrazol wird der Amiditbaustein zu einer sehr reaktiven Spezies, die zu so gut wie keine Nebenreaktionen zeigt.

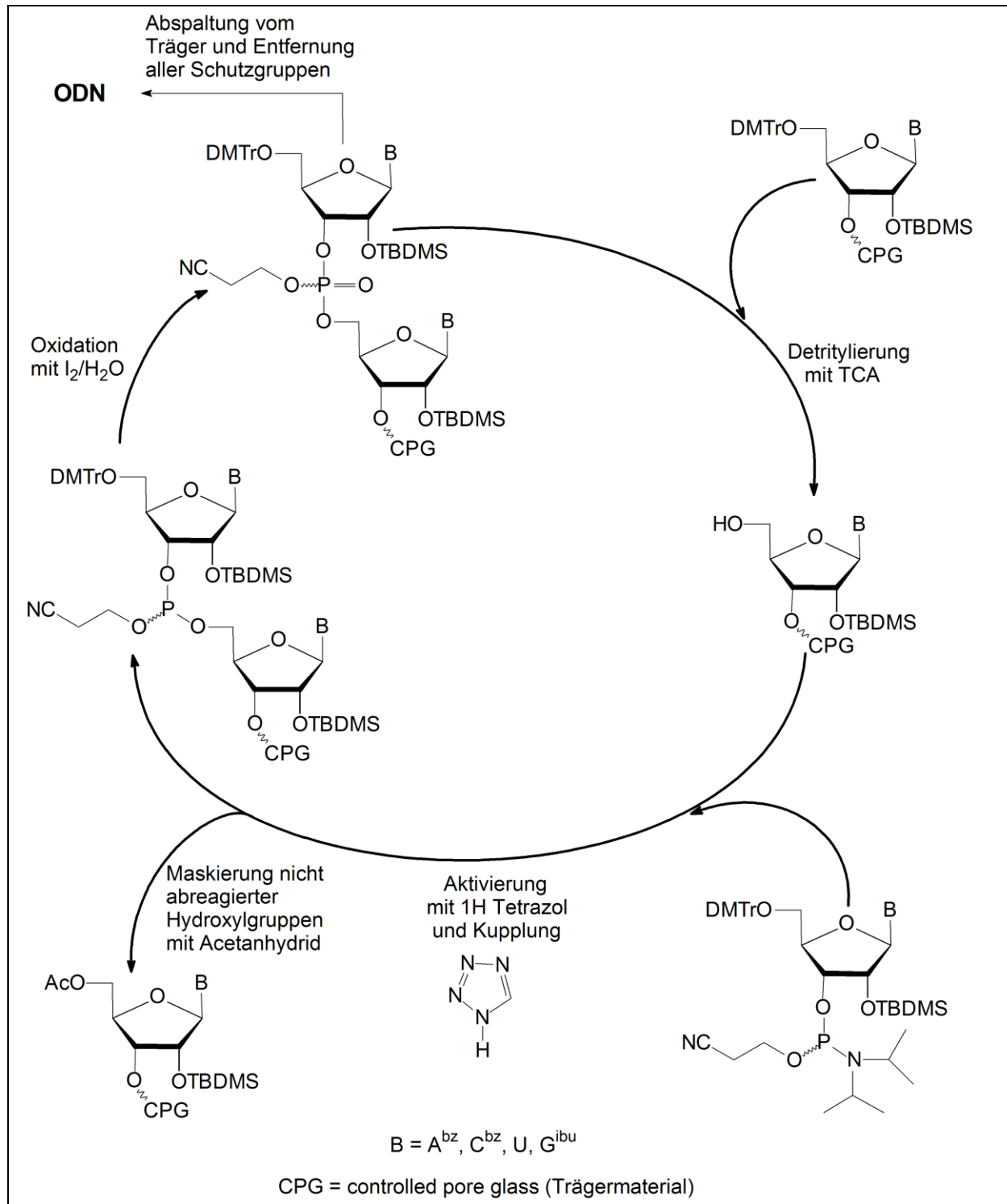


Abbildung 6.2: Oligonukleotid-Festphasensynthesezyklus nach Caruthers

6.3 Synthetisierte Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit synthetisierten Oligonukleotide wurden nach der Phosphoramidit-Methode im 1 µmol Maßstab an Synthesautomaten PerSeptive Biosystems (Modell Expedite 8905) hergestellt. Es wurden vorgefertigte Säulen von PerSeptive Biosystems mit CPG-Trägermaterial, die das erste Nukleosid tragen, eingesetzt. Die Standardnukleosidphosphoramidite und die übrigen Syntheschemikalien sind kommerziell erhältlich (siehe Chemikalienliste). Die Standardkupplungszeit von 10 Minuten für RNA-Bausteine wurde für alle modifizierten Nukleotide übernommen. Bei allen Oligonukleotiden wurde bei der Synthese die finale Dimethoxytriphenylmethylgruppe abgespalten. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die modifizierten Nukleoside, die alle in RNA eingebaut wurden, mit den in Abbildung 6.3. aufgeführten Abkürzungen versehen.

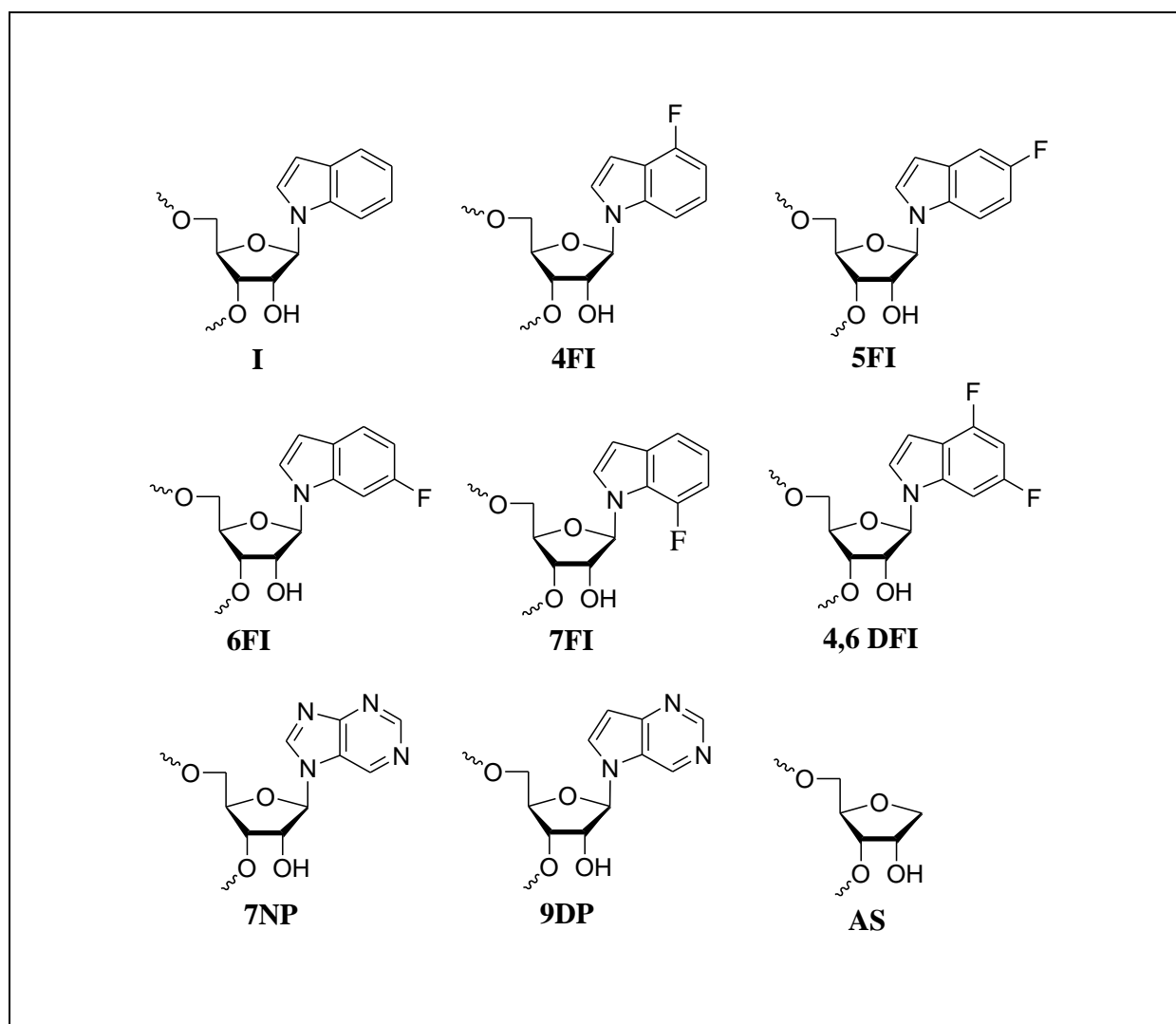


Abbildung 6.3: Verwendete Abkürzungen für die in RNA eingebauten modifizierten Nukleotide

In dieser Arbeit wurden nur RNA Oligonukleotide untersucht, die Duplexe bilden können. Es wurden ein Adenosin-reicher Strang und ein Uridin-reicher Gegenstrang synthetisiert. Alle anderen Stränge gleichen diesen beiden in ihrer Sequenz mit Ausnahme der in der Mitte der Stränge befindlichen Stelle für den Einbau der modifizierten Nukleotide (**S 5** bis **S 25**; Tabelle 6.1). Schließlich wurden noch drei 13mer Oligonukleotide (**S 26** & **S 27** & **S 28**) für Untersuchungen der Basenstapelungswechselwirkungen (Tabelle 6.2) synthetisiert.

Name	Uridin reiche Stränge	Name	Adenosin reiche Stränge
S1	5'-CUU UUC UUU CUU-3	S14	5'-AAG AAG GAA AAG-3'
S2	5'-CUU UUC CUU CUU-3	S15	5'-AAG AAU GAA AAG-3'
S3	5'-CUU UUC AUU CUU-3	S16	5'-AAG AAA GAA AAG-3'
S4	5'-CUU UUC GUU CUU-3	S17	5'-AAG AAC GAA AAG-3'
S5	5'-CUU UUC IUU CUU-3	S18	5'-AAG AAI GAA AAG-3'
S6	5'-CUU UUC 4FIUU CUU-3	S19	5'-AAG AA 4FI GAA AAG-3'
S7	5'-CUU UUC 5FIUU CUU-3	S20	5'-AAG AA 5FI GAA AAG-3'
S8	5'-CUU UUC 6FIUU CUU-3	S21	5'-AAG AA 6FI GAA AAG-3'
S9	5'-CUU UUC 7FIUU CUU-3	S22	5'-AAG AA 7FI GAA AAG-3'
S10	5'-CUU UUC 4,6DFIUU CUU-3	S23	5'-AAG AA 4,6DFI GAA AAG-3'
S11	5'-CUU UUC 7NPUU CUU-3	S24	5'-AAG AA 7NP GAA AAG-3'
S12	5'-CUU UUC 9DPUU CUU-3	S25	5'-AAG AA AS GAA AAG-3
S13	5'-CUU UUC ASUU CUU-3		

Tabelle 6.1: Synthetisierte 12mer Oligonukleotide

13 mer Oligonukleotide	
S26	5'- 6FI AAG AAA GAA AAG-3
S27	5'- 4,6FI AAG AAA GAA AAG-3
S28	5'- 7FI AAG AAA GAA AAG-3

Tabelle 6.2: Synthetisierte 13mer Oligonukleotide

6.4 Aufreinigung von Oligonukleotiden

Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte über Anionenaustausch-HPLC. Diese Methode ist geeignet, um Oligonukleotide in höchster Reinheit zu erhalten. Die

Anionen-austausch-HPLC ist die Standardmethode zur Aufreinigung kurzer RNA-Stränge.

Die Anionenaustausch-HPLC trennt nach Ladungsunterschieden. Das Prinzip dieser sehr effektiven Methode beruht auf der Wechselwirkung des negativ geladenen Rückgrats eines Oligonukleotids mit auf der stationären Phase immobilisierten kationischen Gruppen. Die gebundenen Oligonukleotide werden dann mit einem Gradienten von steigender Ionenstärke (Salzgehalt) von der Säule eluiert, wobei das gewünschte Oligonukleotid stets zuletzt freigesetzt wird. Dieses ist, bedingt durch die Methode, stets mit großen Mengen an Salz verunreinigt und muss vor der Verwendung entsalzt werden. Dafür stehen die Methoden der Gelfiltration und der Dialyse zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die Gelfiltration verwendet. Deren Trennprinzip beruht auf der größenabhängigen Diffusion der Probenmoleküle in Poren der stationären Phase. Die polymeren Trennmaterialien, wie z.B. Sephadex G25, besitzen mikroskopische Poren, in welche die kleinen Salzteilchen hinein diffundieren, während die großen Oligonukleotid-Moleküle ausgeschlossen bleiben und somit rasch eluiert werden. Für die Entsalzung wurden in dieser Arbeit fertig gepackte Sephadex-Säulen mit G25-Material, die kommerziell erhältlich sind, eingesetzt.

Abbildung 6.4 zeigt beispielhaft das HPLC Diagramm von Strang **20**. Es ist deutlich das Hauptsignal des sauberen 12mer Oligonukleotides bei 20,4 Minuten zu erkennen. Die Signale vorher stammen von kürzeren Oligonukleotiden, wie sie bei Abbruch der Synthese entstehen.

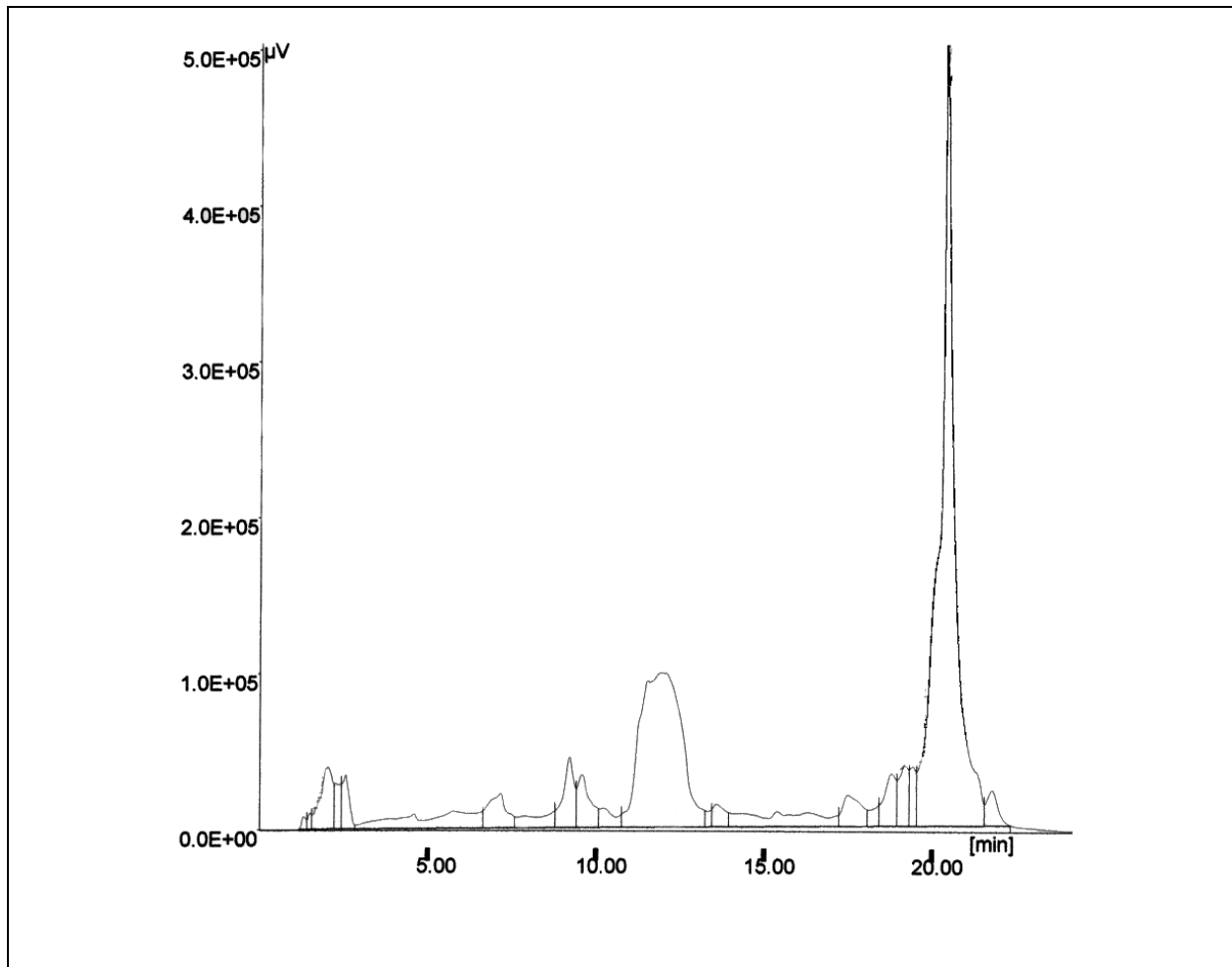


Abbildung 6.4: HPLC Spektrum von Strang **S 20**

Nach erfolgter Aufreinigung und Entsalzung wurden die Mengen des erhaltenen Oligonukleotides durch UV-Spektroskopie quantifiziert. Dazu wird die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der so erhaltene, auch als optische Dichte OD_{260} (engl.: optical density) bezeichnete Wert, liefert bei bekanntem Extinktionskoeffizienten nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration der Probe. Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten ist in Experimentaler Teil erläutert. Die für die hergestellten Oligonukleotide berechneten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 6.3 aufgeführt.

Name	Stränge	Extinktions- koeffizient [260nm]
S1	5'-CUU UUC UUU CUU-3	110,28
S2	5'-CUU UUC CUU CUU-3	99,00
S3	5'-CUU UUC AUU CUU-3	104,08
S4	5'-CUU UUC GUU CUU-3	102,3
S5	5'-CUU UUC IUU CUU-3	99,00
S6	5'-CUU UUC 4FIUU CUU-3	99,00
S7	5'-CUU UUC 5FIUU CUU-3	99,00
S8	5'-CUU UUC 6FIUU CUU-3	99,00
S9	5'-CUU UUC 7FIUU CUU-3	99,00
S10	5'-CUU UUC 4,6DFIUU CUU-3	99,00
S11	5'-CUU UUC 7NPUU CUU-3	104,08
S12	5'-CUU UUC 9DPUU CUU-3	104,08
S13	5'-CUU UUC ASUU CUU-3	100,25
S14	5'-AAG AAG GAA AAG-3'	143,92
S15	5'-AAG AAU GAA AAG-3'	142,51
S16	5'-AAG AAA GAA AAG-3'	145,18
S17	5'-AAG AAC GAA AAG-3'	140,16
S18	5'-AAG AAI GAA AAG-3'	140,16
S19	5'-AAG AA 4FI GAA AAG-3'	140,16
S20	5'-AAG AA 5FI GAA AAG-3'	140,16
S21	5'-AAG AA 6FI GAA AAG-3'	140,16
S22	5'-AAG AA 7FI GAA AAG-3'	145,18
S23	5'-AAG AA 4,6DFI GAA AAG-3'	140,16
S24	5'-AAG AA 7NP GAA AAG-3'	145,18
S25	5'-AAG AA AS GAA AAG-3	133,20

Tabelle 6.3: Errechnete Extinktionskoeffizienten

6.5 Charakterisierung von Oligonukleotiden

Synthetisierte Oligonukleotide können durch Messung der Molekülmassen der erhaltenen Oligonukleotide auf ihren Erfolg hin kontrolliert werden. Es lässt sich mittels Massenspektrometrie feststellen, ob alle Schutzgruppen der Nukleotide vollständig abgespalten wurden. Für massenspektrometrische Untersuchungen standen zwei verschiedene Methoden zur Verfügung. Dies waren die Electrospray-Ionisation- (ESI) und die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation (**matrix-assisted laser desorption/ionisation**, MALDI) Massenspektrometrie. Beide Methoden ermöglichen die unfragmentierte Analyse von Oligonukleotiden mit hoher Empfindlichkeit. Alle Oligonukleotide, die in dieser Arbeit synthetisiert wurden, wurden mittels MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Die MALDI-Analyse ist im Vergleich zur ESI-Massenspektrometrie weniger empfindlich gegenüber Kontamination der Probe mit Salzen, was durch Fällung mit Ammoniumacetat während der Probenvorbereitung noch unterstützt werden kann. RNA-Oligomere zeigen bei MALDI-Untersuchungen eine höhere Stabilität als DNA-Oligomere, da die zusätzliche OH-Gruppe an der 2'-Position offenbar die glykosidische Bindung stabilisiert (Lehmann, 1996).

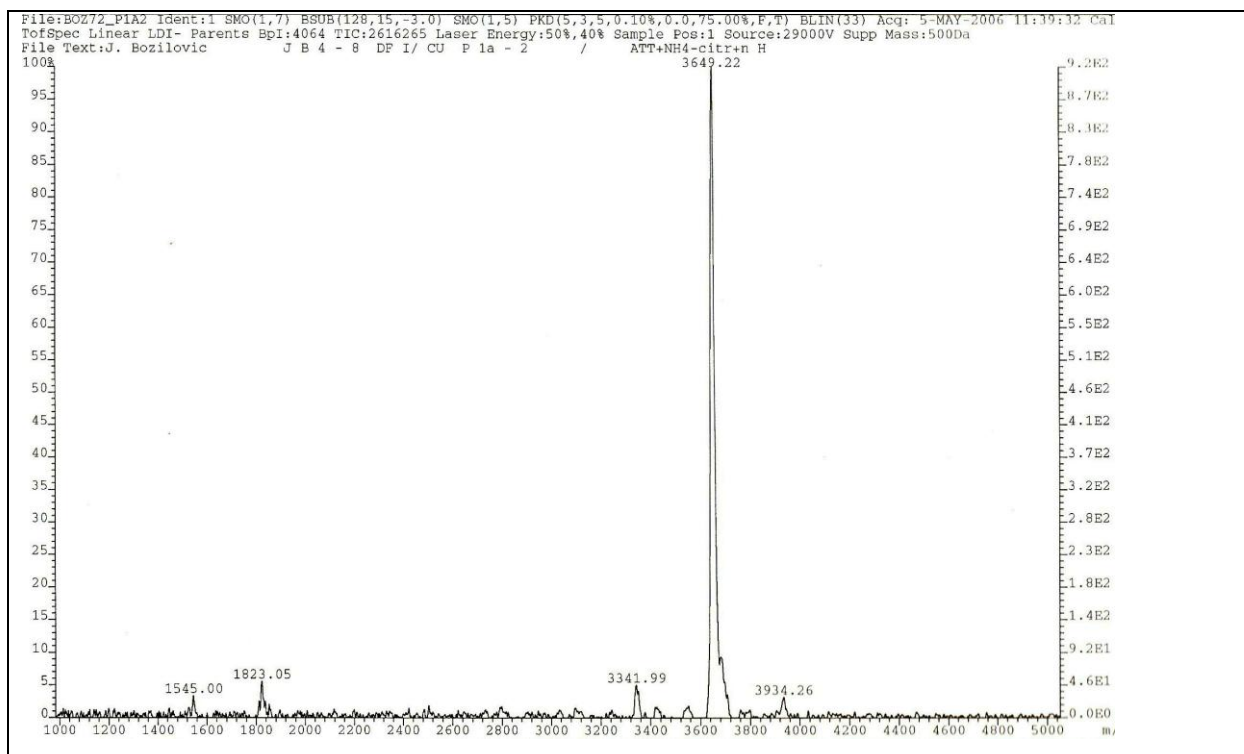


Abbildung 6.5: MALDI-Spektrum des modifizierten Stranges **S 10** (berechnete Masse: 3650,15 Dalton, gefundene Masse: 3649,22 Dalton)

Strang	Sequenz	Berechnete Masse [Da]	Gefundene Masse [Da]
S 1	5'-CUU UUC UUU CUU-3	3609,07	3609,16
S 2	5'-CUU UUC CUU CUU-3	3608,12	3606,65
S 3	5'-CUU UUC AUU CUU-3	3611,07	3634,40
S 4	5'-CUU UUC GUU CUU-3	3648,15	3651,41
S 5	5'-CUU UUC IUU CUU-3	3614,14	3614,93
S 6	5'-CUU UUC 4FIUU CUU-3	3632,15	3631,56
S 7	5'-CUU UUC 5FIUU CUU-3	3632,15	3650,78
S 8	5'-CUU UUC 6FIUU CUU-3	3632,15	3633,77
S 9	5'-CUU UUC 7FIUU CUU-3	3632,15	3632,46
S 10	5'-CUU UUC 4,6DFIUU CUU-3	3650,14	3649,22
S 11	5'-CUU UUC 7NPUU CUU-3	3636,09	3636,27
S 12	5'-CUU UUC 9DPUU CUU-3	3635,13	3634,32
S 13	5'-CUU UUC ASUU CUU-3	3499,00	3513,34
S 14	5'-AAG AAG GAA AAG-3'	3952,55	3952,45
S 15	5'-AAG AAU GAA AAG-3'	3913,51	3959,28
S 16	5'-AAG AAA GAA AAG-3'	3936,52	3939,28
S 17	5'-AAG AAC GAA AAG-3'	3912,50	3915,78
S 18	5'-AAG AAI GAA AAG-3'	3934,55	3914,93
S 19	5'-AAG AA 4FI GAA AAG-3'	3952,55	3952,79
S 20	5'-AAG AA 5FI GAA AAG-3'	3952,55	3950,51
S 21	5'-AAG AA 6FI GAA AAG-3'	3952,55	3951,28
S 22	5'-AAG AA 7FI GAA AAG-3'	3952,55	3954,18
S 23	5'-AAG AA 4,6DFI GAA AAG-3'	3970,55	3972,27
S 24	5'-AAG AA 7NP GAA AAG-3'	3920,55	3920,55
S25	5'-AAG AA AS GAA AAG-3	3803,41	3804,24
S 25	5'- 6FI AAG AAA GAA AAG-3	4254,67	4255,92
S 25	5'- 4,6FI AAG AAA GAA AAG-3	4271,66	4270,88
S 26	5'- 7FI AAG AAA GAA AAG-3	4254,67	4260,76

Tabelle 6.6: Übersicht über die synthetisierten Oligonukleotide, deren berechnete und gefundene Massen

Für die Charakterisierung mittels Massenspektrometrie wurden die reinsten, salzärmsten Fraktionen verwendet.

6.6 Verteilungskoeffizienten

Von allen synthetisierten modifizierten Nukleosiden wurden 1-Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten bestimmt. Dazu wurden immer die voll entschützten Nukleoside verwendet. Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten werden als Maß für die Lipophilie und damit für die Membrangängigkeit in biologischen Systemen angesehen (Gombar & Enslein, 1996, Leo et al., 1971). Verteilungskoeffizienten werden mit $\log P$ angegeben. Je größer der Wert von $\log P$ ist, desto lipophiler sind die untersuchten Substanzen. Durch die Möglichkeit der Betrachtung der Lipophilie eines gesamten Moleküls sind die Verteilungskoeffizienten besonderes für pharmakologische Untersuchungen interessant.

Aus den gemessenen Extinktionen der wässrigen und der octanolischen Phasen (siehe Experimentaler Teil) lassen sich die Verteilungskoeffizienten nach folgender Formel berechnen:

$$\log P = E_{\text{Octanol}} / E_{\text{Wasser}}$$

Dabei ist E_{Octanol} die gemessene Extinktion der octanolischen Phase und E_{Wasser} die Extinktion der wässrigen Phase. Tabelle 6.7 zeigt die gemessenen Werte der einzelnen Nukleoside.

Nukleobase der vermessenen Nukleoside	Verteilungskoeffizient $\log P$
Indol	0,72
4-Fluorindol	2,78
5-Fluorindol	2,45
6-Fluorindol	4,42
4,6-Difluorindol	5,54
7-Fluorindol	2,38
7-N-Purin	1,24
9-Deazapurin	2,87

Tabelle 6.7: Verteilungskoeffizienten der voll entschützten Nukleoside

7 Spektroskopische Untersuchungen der Oligonukleotide

7.1 UV-spektroskopische Untersuchungen

Mit Hilfe der UV-Spektroskopie kann man den Schmelzpunkt eines Nukleinsäure-Duplex bestimmen. Unter dem Schmelzpunkt eines Duplex versteht man die Temperatur, bei der genau die Hälfte der Moleküle einer Probe noch als Duplex vorliegt. Die andere Hälfte der Duplexe ist bei dieser Temperatur schon aufgeschmolzen und liegt als Einzelstränge vor. Bei den UV-spektroskopischen Untersuchungen macht man sich zu Nutze, dass sich die Extinktion der Nukleinsäuren beim Übergang von geordneter zur ungeordneter Struktur ändert.

Diese Änderung ist die Grundlage der temperaturabhängigen UV-Spektroskopie. Durch Erhöhung der Temperatur wird der Duplex aufgeschmolzen und dabei durch Änderung der Basenstapelungswechselwirkungen der Heterozyklen der Nukleotide die Extinktion verändert. Bei einem Übergang von der geordneten Struktur (Duplex) in eine ungeordnete Struktur (Knäuel-Struktur) nimmt die Extinktion zu. In diesem Fall spricht man von Hyperchromizität. Aus der Kurve, die durch die Zunahme der Hyperchromizität bei Temperaturerhöhung resultiert, kann der Schmelzpunkt eines Duplexes bestimmt werden. Der Schmelzpunkt ist allerdings nicht nur von der Länge und Sequenz des Duplexes abhängig, sondern auch von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung, in der die Probe vermessen wird. Durch Erhöhung der Salzkonzentration steigt auch der Schmelzpunkt an (Puglisi & Tinoco, 1989). Abbildung 7.1 zeigt die Schmelzkurve des Duplexes aus den beiden unmodifizierten Strängen **S 1** und **S 14**. Bei beiden Strängen handelt es sich um 12mer RNA-

Stränge, die in einem Phosphatpuffer mit 140 mM Natriumchlorid bei pH 7,0 vermessen wurden. Zu erkennen ist der typische sigmoidale Verlauf der Schmelzkurve. Der Schmelzpunkt dieses Überganges wurde mit 42,3°C bestimmt.

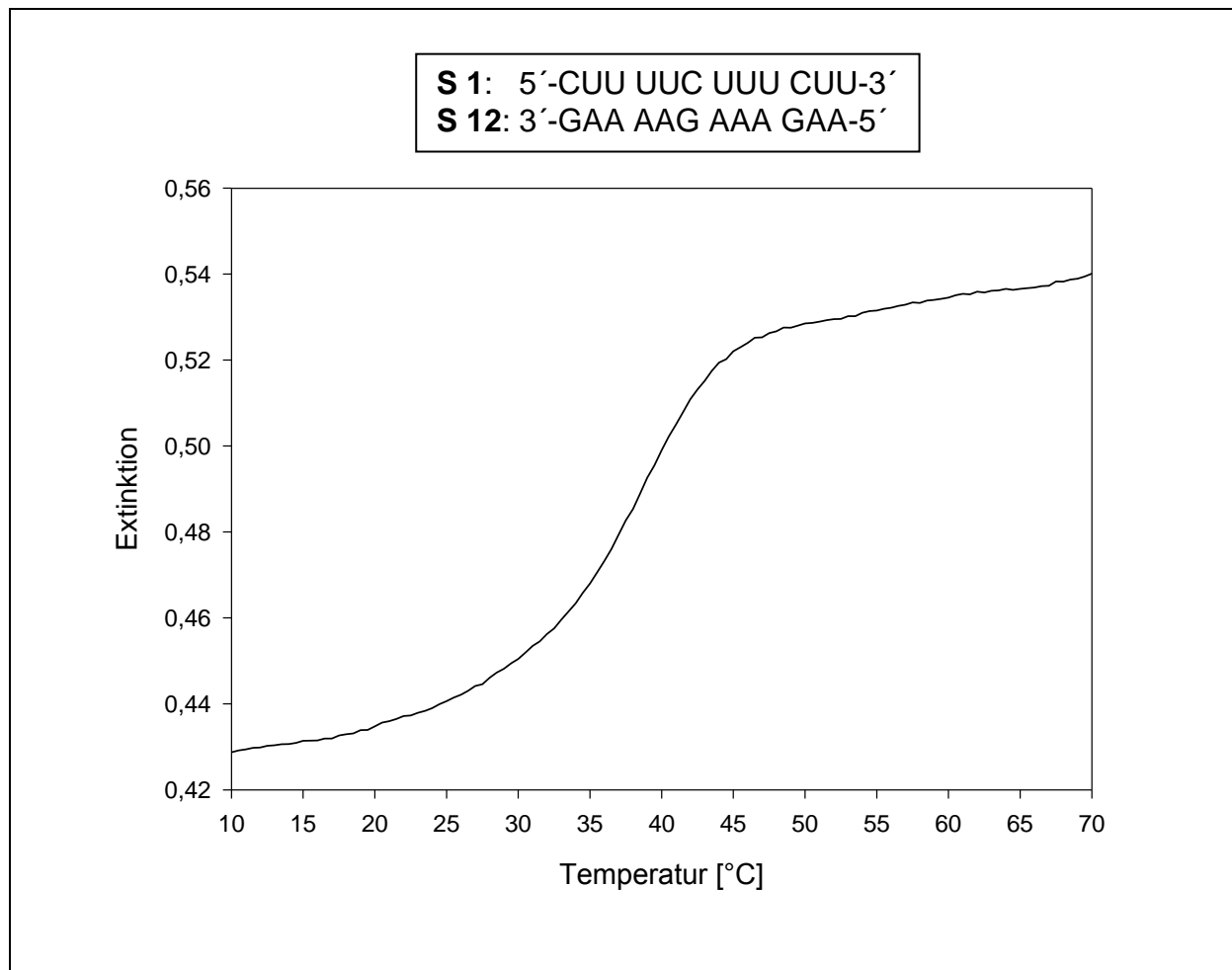


Abbildung . 7.1: UV-Schmelzkurve des Duplexes aus **S 1** und **S 14**

Das Ausmaß der Änderung der Extinktion ist wellenlängenabhängig. Das Hypochromizitätsmaximum liegt für AT-Basenpaare bei 260 nm und für GC-Basenpaare bei 276 nm (Abbildung 7.2). Für die Messung eines gemischten Oligonukleotids liegt die optimale Wellenlänge zwischen diesen Werten. Routinemäßig wird meist bei 260 und 274 nm gemessen. Charakteristisch für das Schmelzen von Nukleinsäurestrukturen ist die Kooperativität des Prozesses (Saenger, 1984), d.h. dass ein Nukleosid einen Einfluss auf die Konformation seines Nachbarn ausübt. Wird ein Basenpaar getrennt, so lösen sich auch die Wasserstoffbrücken des benachbarten Basenpaares schnell auf. Die Struktur der Doppelhelix verschwindet und es entstehen ungepaarte Einzelstränge. Die

Aufspaltung der Struktur beginnt meist an einem Ende der Doppelhelix und bewegt sich schnell vergleichbar einem Reißverschluss durch die Helix. Eine Folge der Kooperativität des Schmelzvorganges ist die Tatsache, dass kurze Oligonukleotid-Komplexe nur nativ (geordnet) oder denaturiert (ungeordnet) vorliegen, Zwischenstufen jedoch nicht anzutreffen sind (Alles-oder-Nichts-Modell).

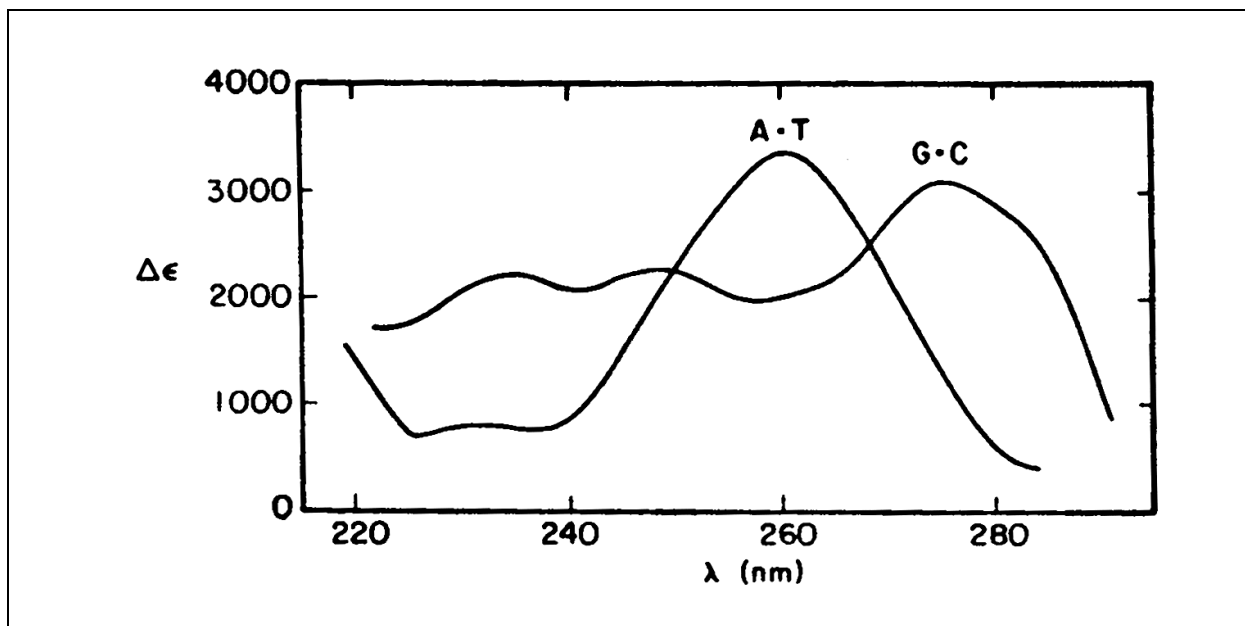


Abbildung. 7.2: Wellenlängenabhängige Veränderung der Extinktionskoeffizienten von GC- und AT-Basenpaaren in DNA (Felsenfeld & Hirschman, 1965)

Aufgrund ihrer leichten Durchführbarkeit, der hohen Empfindlichkeit und der geringen benötigten Substanzmengen ist die UV-Spektroskopie die Methode der Wahl zur Bestimmung von Schmelzkurven von Oligonukleotiden. Neben der UV-Spektroskopie stehen allerdings auch noch andere Methoden wie z.B. die CD-Spektroskopie zur Verfügung.

Allgemein gilt, je höher der Schmelzpunkt, desto stabiler ist die untersuchte Struktur. Neben der Bestimmung des Schmelzpunktes können aus Schmelzkurven auch die thermodynamischen Größen ΔH^0 , ΔS^0 und ΔG^0 gewonnen werden. Es ist dabei zu beachten, dass diese Daten nur aussagekräftig sind, wenn das Alles-oder-Nichts-Modell uneingeschränkt gilt und die Messung im thermodynamischen Gleichgewicht durchgeführt wurde.

7.2 Auswertung der UV-Schmelzkurven

7.2.1 Bestimmung des Schmelzpunktes

Die UV-Schmelzkurven wurden in einem Zweistrahl UV-/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian gemessen. Als Puffer diente ein Phosphat-Puffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 10 mM Natriumdihydrogen-phosphat mit einem pH-Wert von 7,0.

Zur Messung wurde die Probenküvette mit Puffer befüllt und beide zu untersuchenden Stränge in einer Konzentration von je 2 μM einpipettiert. Die Aufnahme der Schmelzkurven erfolgte bei 260 und 274 nm (Nullabgleich bei 350 nm) mit einer Heizrate von 0,5°C/min. (Details zur Durchführung der UV-Schmelzexperimente siehe in Experimenteller Teil)

Zur Auswertung der Schmelzkurven muss zuerst Klarheit über die Molekularität des untersuchten Übergangs und die Beschaffenheit der eingesetzten Sequenzen bestehen (selbstkomplementär oder nicht selbstkomplementär). Alle in dieser Arbeit untersuchten Sequenzen waren nicht selbstkomplementär und der untersuchte Übergang Duplex \rightarrow Einzelstränge ist jeweils bimolekularer Natur. Die Molekularität des Übergangs lässt sich leicht aus dessen Konzentrationsabhängigkeit ermitteln. Während der T_m unimolekularer Reaktionen (z.B. Haarnadelschleife \rightarrow Knäuel) konzentrationsunabhängig ist, ist er bei bi- oder höhermolekularen Reaktionen stets von der Konzentration abhängig.

Für die thermodynamische Analyse muss die Schmelzkurve eines Duplexes (Extinktion als Funktion der Temperatur) (Abbildung 7.3a) in eine Darstellung des Bruchteils des geordneten Zustandes (α) als Funktion der Temperatur überführt werden (Abb. 7.3d) (Marky & Breslauer, 1987). Zu diesem Zweck betrachtet man den Schmelzvorgang unter Annahme eines Zwei-Zustands-Modells (Alles-oder-Nichts-Modell). Dieses Modell geht davon aus, dass die native Struktur mit der denaturierten in einem Gleichgewicht ohne populierte Zwischenstufen steht. Für die Transformation von $OD = f(T)$ in $\alpha = f(T)$ ist eine Anpassung von Basislinien an den oberen und

unteren linearen Bereich der Schmelzkurve notwendig (Abb. 7.3c). Dies berücksichtigt die Temperaturabhängigkeit der Extinktion. Die Basislinienanpassung erfolgt unter Annahme eines linearen Verhaltens und lässt sich wie folgt ausdrücken:

$$OD_u = m_u \cdot T + b_u$$

$$OD_o = m_o \cdot T + b_o$$

(OD = Extinktion (engl.: absorbance), m = Steigung, T = Temperatur, b = Ordinaten-schnittpunkt, u = untere Basislinie, o = obere Basislinie)

Wenn der untere oder obere Bereich der Schmelzkurve nur wenig ausgebildet ist, so ist eine korrekte Basislinienanpassung erschwert. In einem solchen Fall ist die Bestimmung thermodynamischer Parameter über die Analyse der Kurvenform nicht möglich, da eine schlechte Anpassung der Basislinien die größte Fehlerquelle bei dieser Art der Auswertung darstellt (Puglisi & Tinoco, 1989).

Da die gemessene Extinktion ein direktes Maß für die Anzahl der gestapelten Basen ist, lässt sich die $OD = f(T)$ Kurve in eine $\alpha = f(T)$ Kurve umwandeln, wobei α den Bruchteil des geordneten Zustandes angibt. Die Schmelztemperatur T_m ist als der Wert definiert, an dem gerade die Hälfte der Moleküle denaturiert ist, wo also $\alpha(T)$ gerade 0,5 beträgt.

$$\alpha = [\text{Oligonukleotide im geordneten Zustand}] / [\text{Gesamtmenge an Oligonukleotid}]$$

$$\alpha = \frac{\{[OD_o] - [OD(T)]\}}{\{[OD_o] - [OD_u]\}}$$

Für die Assoziation eines nicht selbstkomplementären dritten Stranges an eine Doppelhelix gilt:



und

$$K = [D] / [S]^2$$

Die Gleichgewichtskonstante K dieses Vorgangs lässt sich unter der Voraussetzung, dass alle Stränge in gleicher Konzentration vorliegen, in Werten von α ausdrücken:

$$\{(1-\alpha) \cdot c_t/n\} \cdot \{(1-\alpha) \cdot c_t/n\} \rightleftharpoons \alpha \cdot c_t/n$$

und

$$K = \{ \alpha \cdot c_t/n \} / \{ \{(1-\alpha) \cdot c_t/n\} \cdot \{(1-\alpha) \cdot c_t/n\} \}$$

Eine Vereinfachung von letzte Gleichung und Anwendung auf eine beliebige Molekularität liefert:

$$K = \{ \alpha c_t/n \} / \{ (1-\alpha) \cdot (c_t/n) \}^n$$

mit c_t = totale Strangkonzentration = [Strang 1] + [Strang 2] und n = Molekularität des Überganges.

$$K = \alpha / \{ (1-\alpha)^n \cdot (c_t/n)^{(n-1)} \}$$

Für die Gleichgewichtskonstante gilt demnach am Punkt $T = T_m$ mit $\alpha = 0,5$:

$$K_{T=T_m} = 0,5 / \{ (0,5)^n \cdot (c_t/n)^{(n-1)} \} = 1 / (c_t/2n)^{(n-1)}$$

Letzte Gleichung ermöglicht die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten am Schmelzpunkt für eine Assoziationsreaktion jeglicher Molekularität zwischen nicht selbstkomplementären Sequenzen. Im Falle einer bimolekularen Assoziation beträgt n zwei und letzte Gleichung vereinfacht sich zu:

$$K_{T=T_m} = 1 / (c_t/4) = 4 / c_t$$

Das bedeutet, dass die Gleichgewichtskonstante K bei bimolekularen Reaktionen am T_m alleine eine Funktion der totalen Strangkonzentration c_t ist.

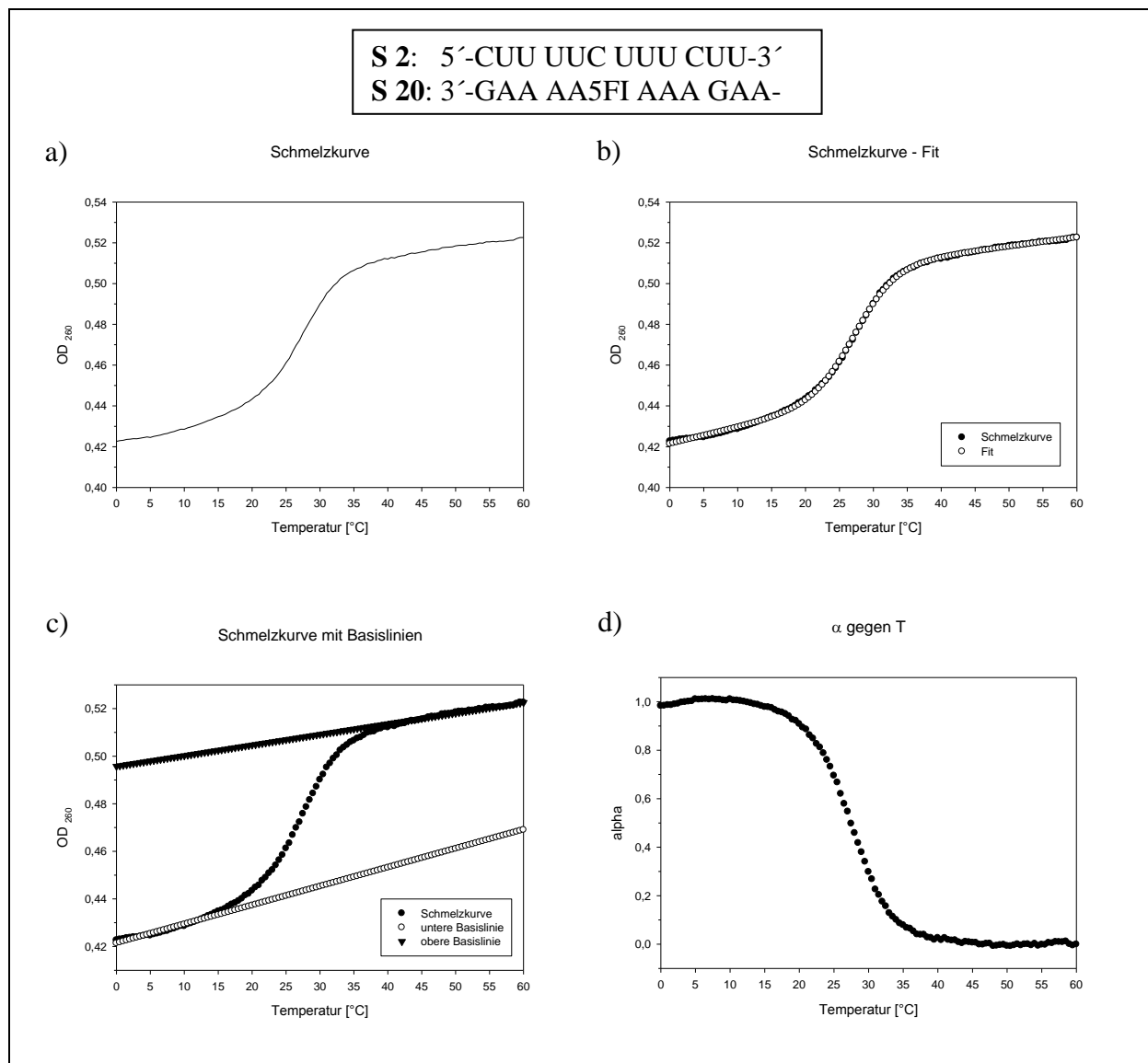


Abbildung. 7.3: a) UV-Schmelzkurve des Duplexes aus den Strängen **S 2** und **S 20**,
 b) Überlagerung Schmelzkurve und Fit, c) Schmelzkurve mit unterer und
 oberer Basislinie, d) Transformierte Kurve $\alpha = f(T)$

7.2.2 Bestimmung der thermodynamischen Daten

In diesem Abschnitt werden die gängigsten Methoden zur Bestimmung der thermodynamischen Daten aus spektroskopischen Untersuchungen erklärt und in ihren Vor- und Nachteilen gegeneinander abgewogen. Die ihnen zugrundeliegenden mathematischen Gleichungen werden hergeleitet.

Sobald die Molekularität des untersuchten Überganges bekannt ist, können thermodynamische Parameter auf verschiedene Arten berechnet werden. Unsere Methode ist die so genannte van't Hoff Auftragung von $R \ln K$ als Funktion von $1/T$. Eine zweite Möglichkeit besteht in der numerischen Differentiation von α nach T am Punkt $T = T_m$. Werden konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt, bietet sich die Auftragung von $1/T_m$ gegen $\ln c_t$ an. Eine vierte Variante ist eine Computergestützte Anpassung einer Kurve an die Messwerte mit Hilfe eines geeigneten Algorithmus.

Methode 1: Auftragung von $R \ln K$ gegen $1/T$; der van't Hoff Plot

Werte für die Gleichgewichtskonstante K können für jede Temperatur mit Hilfe von Gleichung $K = \alpha / \{(1 - \alpha)^n \cdot (c_t/n)^{(n-1)}\}$ und Einsetzen von zwei für die Molekularität n berechnet werden. Dabei werden im van't Hoff Plot nur Punkte mit $0,15 \leq \alpha \leq 0,85$ verwendet, da die Werte für K in diesem Bereich präzise sind. Gleichung

$\Delta G^\circ = -RT \ln K$ gibt die Beziehung zwischen ΔG° und K an:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

Die Umformung der Basisgleichung

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

zu

$$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ) / T$$

Das liefert:

$$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ + RT \ln K) / T$$

Eine einfache Umformung führt zu Gleichung

$$R \ln K = -\Delta H^\circ \cdot 1/T + \Delta S^\circ$$

Eine Auftragung von $R \ln K$ gegen $1/T$ liefert als Steigung $-\Delta H^\circ$ und als Ordinaten-Schnittpunkt ΔS° . Ein Beispiel findet sich in Abb. 7.4. Wenn ΔH° temperaturunabhängig ist, sollte die Auftragung eine Gerade liefern. Eine nichtlineare van't Hoff Auftragung kann mehrere Ursachen haben: Die Temperaturabhängigkeit

von ΔH^0 , eine schlechte Anpassung der Basislinien oder ein Übergang, der nicht dem Alles-oder-Nichts-Modell folgt.

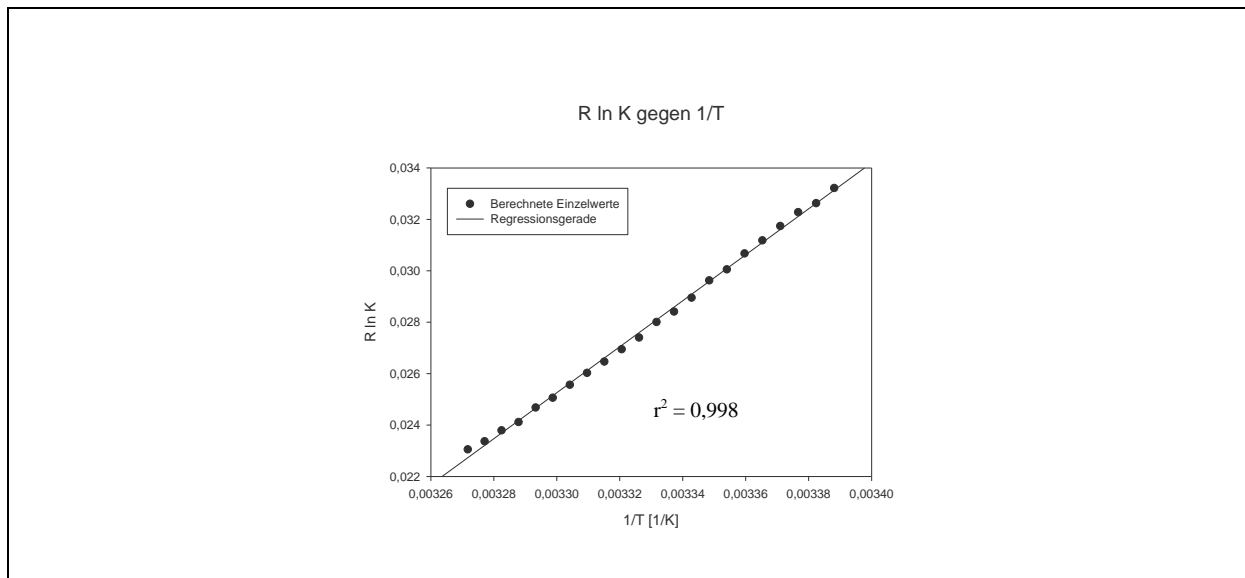


Abbildung. 7.4: van't Hoff Auftragung von $R \ln K$ gegen $1/T$ (Methode 1). Beides am Beispiel des Duplexes aus **S 2** und **S20**

7.3 Ergebnisse der UV-Schmelzkurven

Für die Evaluierung des Einflusses des Nukleosidanaloga wurden die komplementären Strängen hybridisiert und die Schmelzpunkte der Duplexe gemessen. Die errechneten Werte gelten für die Dissoziationsreaktion. Bei den RNA Duplexen handelte es sich immer um 12mer Oligonukleotide, einzig die beiden Stränge zur Kontrolle der Basenstapelungswechselwirkung sind 13mere. Die in dieser Arbeit synthetisierten Modifikationen werden zur besseren Übersichtlichkeit mit Abkürzungen benannt (Abbildung 7.5).

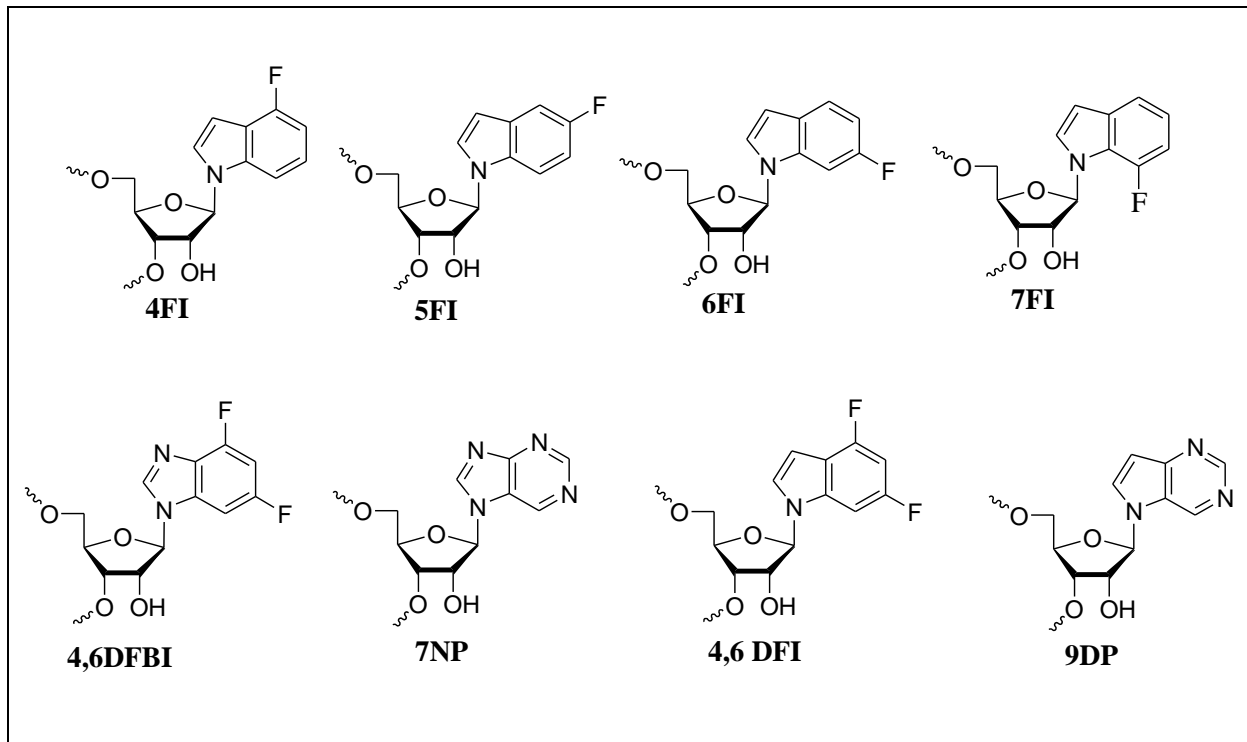


Abbildung 7.5: Verwendete Abkürzungen für die in RNA eingebauten Nukleoside

Alle gemessenen T_m -Werte finden sich in Tabelle 7.1. Das natürliche Basenpaar Uracil-Adenin bildete überraschend nicht den stabilsten Duplex, sondern das Basenpaar Uracil-Guanin. Bei dem Basenpaar Uracil-Guanin handelt es sich um ein „Wobble Basenpaar“. Bei „Wobble-Basenpaaren“ sind die Basen leicht gegeneinander verschoben, so dass das Wasserstoffbrückendonator-/Akzeptor-Verteilungsmuster der Nukleobasen wieder zueinander passt und zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können. Die Verschiebung der beiden Nukleobasen zu einem „Wobble-Basenpaar“ und die daraus resultierenden Wasserstoffbrücken sind in Abbildung 7.6 zu erkennen.

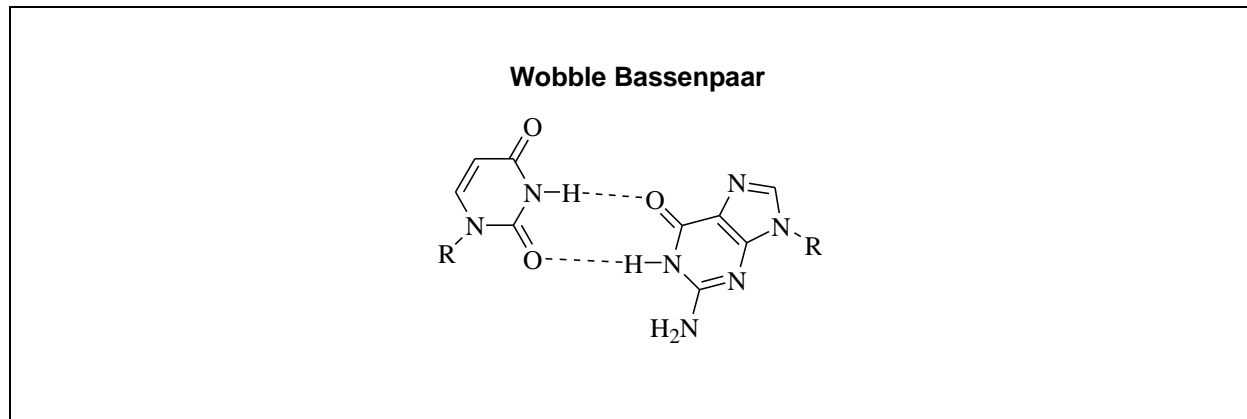


Abbildung 7.6: Uracil-Guanin Basenpaar

Der Schmelzpunkt eines Oligonukleotid-Duplexes ist von der Länge und Sequenz des Duplexes sowie von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Lösung abhängig. Je länger eine Sequenz ist und je reicher an G-C-Basenpaaren, desto stabiler ist ein Duplex. Somit liegt auch die Schmelztemperatur höher. Hohe Salzkonzentrationen können auch zu einer Steigerung der Duplexstabilität führen (Puglisi & Tinoco, 1989). Aus diesem Grund werden die T_m -Wertmessungen unter standardisierten Bedingungen (10 mM Phosphatpuffer mit 140 mM Natriumchlorid bei pH 7,0) durchgeführt.

Basenpaar 1.Base	Basenpaar 2.Base	T_m [°C]	ΔH° [kcal /mol]	$T\Delta S^\circ$ [kcal/mol] ($T=298K$)	ΔG° [kcal/mol] ($T=298K$)
4FI	AS	20,7	89,00	81,6	7,4
	A	25,1	68,6	60,3	8,3
	C	24,1	88,7	80,7	8,0
	G	21,4	55,6	48,0	7,6
	U	21,0	75,7	68,5	7,2
5FI	AS	25,2	82,0	73,7	8,3
	A	32,8	58,3	48,6	9,7
	C	26,8	58,2	49,6	8,6
	G	29,3	64,1	54,8	9,3
	U	25,0	84,2	76,0	8,2
6FI	AS	33,5	55,5	45,3	10,2
	A	37,1	85,1	74,5	10,6
	C	34,6	95,4	84,0	15,4
	G	35,5	100,7	89,4	11,3
	U	31,7	78,2	68,5	9,7
7FI	AS	26,4	82,3	73,7	8,6
	A	34,4	54,4	44,5	9,9
	C	24,8	80,0	71,8	8,2
	G	24,6	74,1	82,3	8,3
	U	29,8	73,8	64,3	9,5

4,6DFI	AS	25,3	67,7	59,3	8,4
	A	33,8	56,9	47,7	9,2
	C	32,0	58,3	48,9	9,4
	G	30,2	60,4	50,7	9,7
	U	29,0	72,7	63,5	9,2
I	AS	23,9	82,6	74,5	8,1
	A	25,5	79,4	71,5	7,9
	C	24,7	91,7	83,4	8,3
	G	21,8	87,1	80,5	6,6
	U	21,0	76,0	68,5	7,5

Tabelle 7.1: Schmelzpunkte und thermodynamische Daten von Basenpaaren aus Basen-analogen Nukleosiden und natürlichen Nukleobasen

Um die Eigenschaften einer universellen Base zu überprüfen wurden auch bei diesen Untersuchungen alle vier möglichen RNA-Stränge verwendet.

7.3.1 Fluorierte Indole

Alle erhaltenen Schmelzpunkte liegen unter denen der Duplexe natürlicher Basenpaare (Abbildung 7.7). Es kommt somit zu einer Destabilisierung der Doppelhelix bei Einbau eines modifizierten Bausteines. Die einzelnen Bausteine wirken sich unterschiedlich auf die Stabilität der RNA aus. Der 4-Fluorindol-Baustein hat den größten destabilisierenden Effekt. Durch den Einbau von **4FI** gegenüber Adenosin wird der Schmelzpunkt um 21,8°C im Vergleich zu einem Uridin erniedrigt. Dies konnte durch das Fehlen der Wasserstoffbrücken und eventuell eine spezifische Orientierung in Doppel-Strang erklärt werden. Es ist nicht einfach vergleichbar mit Kristallpackung, aber eine interessante Tatsache ist, dass die gemessene F...H Abstände zwischen dem Fluoratom und einem Wasserstoffatom, welches sich in *ortho*-Position zu einem Fluoratom eines im Kristall gegenüberliegenden Moleküls befindet länger als Summe der van-der-Waals Radien von Fluor und Wasserstoff sind in der Kristallpackung des 4-Fluorindol-Nukleosides.

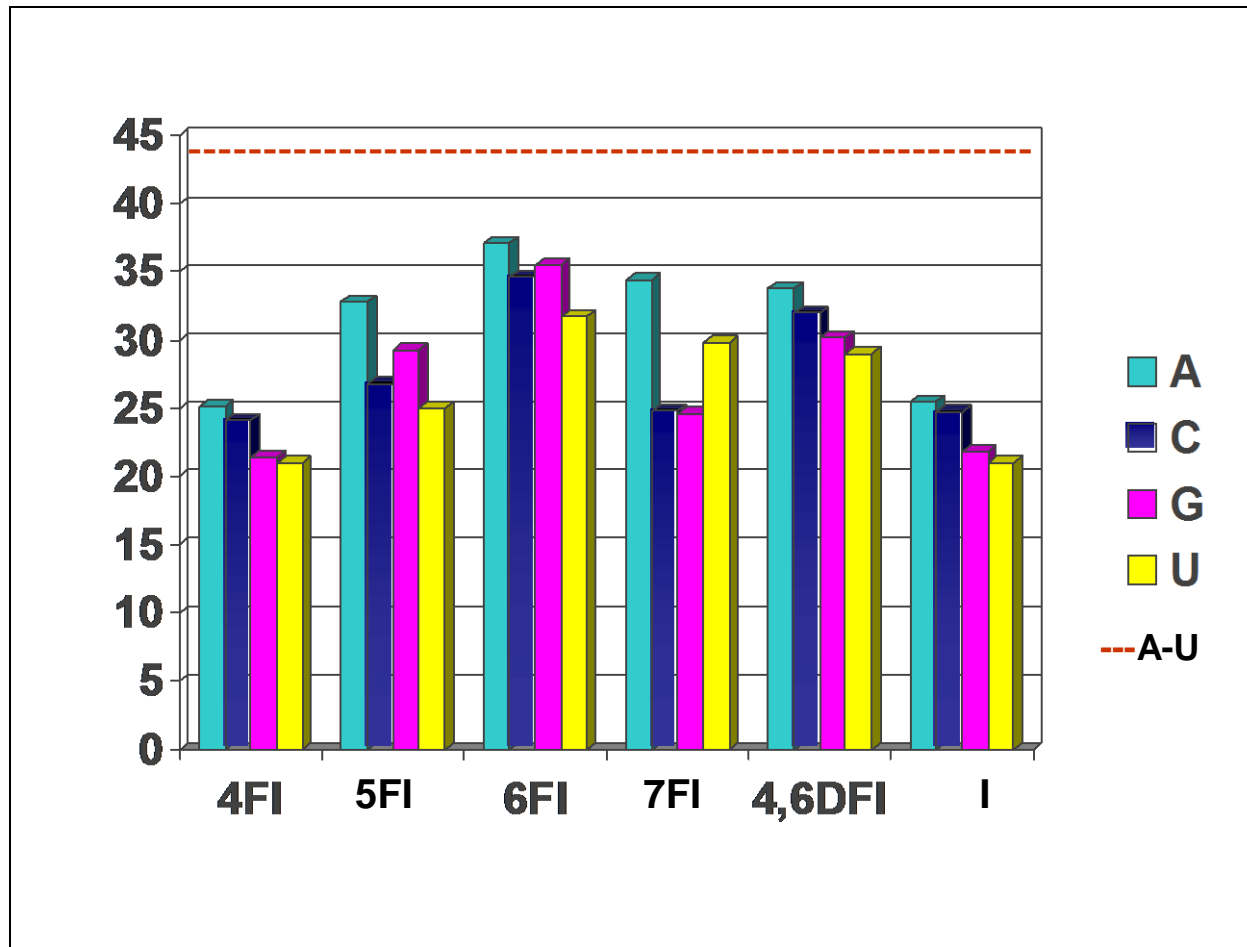


Abbildung 7.7: Graphische Vorstellung Fluorierte Indol-Nukleoside bei Paarung mit natürlichen Basen

Die stabilste Duplexe bildet das 6-Fluorindol-Nukleosid. Die Destabilisierung im Vergleich zu einem Uracil-Adenin Basenpaar ist beim 6-Fluorindol nur 5,7°C. Einführung von zwei Fluoratomen in die schlechteste 4- und in die um besten stabilisierende 6-Position verdeutlichen den Einfluss der Position des Fluoratoms auf die Stabilität der Doppelhelix. Die gemessenen Schmelzpunkte des 4,6-Difluorindol-Nukleosides sind fast der arithmetische Mittelwert der zwei Nukleoside. Gemessene Werte variieren im Vergleich mit gerechneten Mittelwerten um $\pm 3^\circ\text{C}$, was fast im Fehlerbereich liegt.

Einführung eines Fluors an der 5- oder 7-Position des Indols führt zu einer Stabilisierung der Doppelhelix um zwei bis fünf Grad Celsius verglichen mit 4-Fluorindol-Nukleosid. Bei der Paarung von fluorierten Indolen mit einer Pyrimidin- oder Purin-Base zeigt keine Analogie. Beim 7-Fluorindol-Nukleosid sind die resultierenden Schmelzpunkte, bei der Paarung mit A und U höhere Werte, als bei der Paarung mit C und G. Es ist deshalb denkbar, welche Rolle die Position des

Fluoratoms spielt. Die Größe der eingebauten Modifikation hat deutlich keine entscheidende Rolle.

Aufgrund der Resultate der Schmelzkurven der RNA-Duplexe, in denen fluoriierte Indole eingebaut sind, kann festgestellt werden, dass es sich bei diesen Verbindungen nicht um universelle Basen handelt. Bei der Basenpaarung von natürlichen Basen mit fluoriierte Indole findet eine deutliche Unterscheidung zwischen den natürlichen Nukleosiden statt.

Im Vergleich mit fluoriierte Benzimidazole, bilden fluoriierte Indole die stabileren RNA-Duplexe. Wie bei den Benzimidazolen resultiert, die Einführung des Fluors in Position 6- mit der Bildung der stabilsten RNA-Duplexe. Während es sich bei 4-Fluorbenzimidazol und 4,6- Difluorbenzimidazol um universelle Basen handelt, ist es bei Indolen nicht der Fall.

Zum Unterschied von Benzimidazolen, deren T_m -Werte relativ nahe beieinander liegen, zeigen die Indole immer eine Paarungstendenz mit A.

Aus den gemessenen Schmelzpunkten der einzelnen Basenpaare lassen sich die Beiträge von Solvation und Basenstapelungswechselwirkungen der einzelnen fluormodifizierten Nukleoside berechnen. Die Berechnung wird im Folgenden anhand von **5FI** beschrieben. Für die Berechnung der Beiträge der Solvation und der Basenstapelungswechselwirkung werden die in Tabelle 7.2 aufgeführten Schmelzpunkte benötigt.

	Basenpaar	T_m [°C]	ΔG^0 [kcal/mol]
1)	AS – U	22,5	7,7
2)	U – U	32,8	9,9
3)	U – 5FI	25,0	8,2
4)	5FI – 5FI	27,9	9,2
5)	5FI – AS	25,2	7,4

*Tabelle 7.2: Benötigte Daten zur Berechnung der Solvations- und Basenstapelungsbeiträge von **5FI**.*

Für die Berechnung werden das Basenpaar aus dem abasischen Baustein **AS** und einem Uracil (1), ein Basenpaar aus zwei Uracilen (2), ein Basenpaar aus einem Uracil und **5FI** (3), ein **5FI-5FI** Basenpaar (4) und ein Basenpaar aus **5FI** und einem abasischen Baustein **AS** (5) betrachtet. Der Beitrag durch veränderte Basenstapelungswechselwirkungen von **5FI** zur Stabilität der Doppelhelix im

Vergleich zu einem Uracil lässt sich aus den Schmelzpunkten von (1) und (5) aus Tabelle 7.2 berechnen. Durch den Austausch von Uracil gegen **5FI** nimmt der Schmelzpunkt um 2,7°C zu. Dies entspricht einer Zunahme der Stabilität der Doppelhelix um 0,3 kcal/mol. Solvationseffekte brauchen bei diesem Austausch nicht beachtet zu werden, da es sich bei dem zweiten Nukleosid des Basenpaares um den abasischen Baustein handelt, der keine Nukleobase trägt und damit auch nicht an der Nukleobase solvatisiert sein kann. Es werden somit bei der Ausbildung der Doppelhelix keine Wasserstoffbrücken gelöst und damit treten auch keine negativen Einflüsse durch Solvationseffekte auf die Stabilität des RNA-Duplex auf.

Den Einfluss der Solvation auf die Stabilität der Doppelhelix durch Einführung eines Fluorindol-Nukleosids **5FI** lässt sich durch Vergleich der Einträge (3) und (2) in Tabelle 7.2 berechnen. Tauscht man in einen Basenpaar aus zwei Uracilen ein Uracil gegen **5FI** aus, so nimmt der Schmelzpunkt um 7,8°C ab. Wie vorher berechnet, nimmt der Schmelzpunkt einer Doppelhelix aber um 2,7°C durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen zu, wenn ein Uridin durch **5FI** ersetzt wird. Der destabilisierende Einfluss von **5FI** auf die Stabilität einer Doppelhelix durch Solvationseffekte beträgt somit 2,7°C + 7,8°C und damit gleich 10,5°C. Dies entspricht 2,0 kcal/mol.

Die errechneten Werte können durch Vergleich der Einträge (3) und (4) in Tabelle 7.2 kontrolliert werden. Wird das zweite Uridin durch **5FI** in einem Basenpaar ersetzt, so sollten wie schon beschrieben, keine weiteren destabilisierenden Einflüsse durch Solvationseffekte auf die Doppelhelix auftreten. Durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen sollte der Schmelzpunkt des **5FI-5FI** Basenpaares um 2,7°C (0,3 kcal/mol) höher als der Schmelzpunkt eines **5FU-U** Basenpaares liegen. Der erwartete Schmelzpunkt liegt somit bei 27,7°C und die freie Enthalpie ΔG^0 bei 9,2 kcal/mol. Die gemessenen Werte liegen bei 27,9°C und 8,5 kcal/mol. Die Abweichung des Schmelzpunkts und der freien Enthalpie von dem berechneten Wert von 0,2°C bzw. 0,7 liegt im Fehlertoleranzbereich.

Aus den gemessenen Schmelzpunkten der einzelnen Basenpaare lassen sich die Beiträge von Solvation und Basenstapelungswechselwirkungen der einzelnen fluormodifizierten Nukleoside berechnen.

Tabelle 7.3 zeigt die Beiträge von Solvation und Basenstapelungswechselwirkungen auf die Stabilität einer Doppelhelix bei Einbau

der in dieser Arbeit synthetisierten modifizierten Nukleoside. Die Beiträge der Modifizierten-Nukleoside beziehen sich auf einen Vergleich gegenüber Uridin.

Nukleosid	Stabilitätserhöhung durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen	Stabilitätsverlust durch geringere Solvation
4FI	-1,8°C; -0,3 kcal/mol	-10,0°C; -2,4 kcal/mol
5FI	2,7°C; 0,6 kcal/mol	-10,5°C; -2,3 kcal/mol
6FI	11,0°C; 2,5 kcal/mol	-12,1°C; -2,7 kcal/mol
7FI	3,7°C; 0,9 kcal/mol	-6,9°C; -1,5 kcal/mol
4,6DFI	2,8°C; 0,7 kcal/mol	-6,6°C; -1,4 kcal/mol
I	1,4°C 0,4 kcal/mol	-13,2°C; -2,8 kcal

Tabelle 7.3: Beiträge von Solvation und Basenstapelungswechselwirkungen der modifizierten Nukleoside bei einfachem Einbau in eine RNA-Doppelhelix

Es zeigt sich, dass alle, außer **4FI**, modifizierten Nukleoside die Stabilität einer Doppelhelix durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen erhöhen, durch geringere Solvation die Stabilität aber erniedrigen. Die destabilisierenden Solvationseffekte sind dabei immer größer als die stabilisierenden Basenstapelungswechselwirkungen. Das 6-Fluorindol-Nukleosid zeigt die beste Stabilisierung durch Basenstapelungswechselwirkungen mit 11,0°C, aber gleichzeitig zeigt mit 12,1°C eine deutlich höhere Destabilisierung als die anderen Bausteine. Der Ort der Fluorsubstitution für die Basenstapelungswechselwirkungen zeigt einen großen Einfluss. Es ist auch auffallend, dass die Basenstapelungswechselwirkungen des 4-Fluorindol-Nukleosids ein negativer Wert hat. Es ist möglich, dass diese Modifikation eine spezifische Orientierung im RNA-Duplex hat. Theoretisch ist nicht möglich die unterschiedliche Parameter zu vergleichen, aber dafür spricht auch die Beobachtung, dass die gemessenen F...H Abstände in Kristallpackung höher als die Summe der van-der-Waals Radien sind.

Ausgehend davon, dass noch keine negative Stacking ausgerechnet ist, wurden die drei 13mer RNA-Stränge synthetisiert, um die Richtigkeit des erhaltenen Ergebnisses zu überprüfen. Diese Stränge enthalten so genannte überhängende Enden (engl.:

„dangling ends“). Bei der Bildung des Duplex mit einem 12mer RNA Strang bleibt die letzte Base ohne Paarungspartner. Sie bewirkt eine Stabilisierung der Doppelhelix durch Basenstapelungswechselwirkungen. Andere Effekte treten nicht auf, so dass aus dem erhaltenen Schmelzpunkt sofort der Beitrag der Basenstapelungswechselwirkung bestimmt werden kann. Die synthetisierten 13mer RNA Stränge enthielten die **6FI**, **7FI** und **4,6DFI** als überhängende Base. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7.4 zusammengefasst.

Überhängende Base	T_m [°C]	ΔH^0 [kcal/mol]	$T\Delta S^0$ [kcal/mol] (T=298 K)	ΔG^0 [kcal/mol] (T=298 K)
6FI	11,2°C	87,7	85,0	2,7
7FI	4,0	85,1	84,2	0,9
4,6DFI	10,1	87,0	84,5	2,5

Tabelle 7.4: **S 26, S27 und S28**

Aus den Schmelzkurven der beiden Duplexe (S26 und S27) ergeben sich stabilisierende Basenstapelungswechselwirkungen für **6FI** von 11,2°C bzw. 2,7 kcal/mol und für **7FI** von 4,0°C bzw. 0,9 kcal/mol. Diese Ergebnisse stimmen unter Beachtung der Fehlergrenzen mit den vorher ermittelten Ergebnissen überein. Im Fall des Duplex mit 4,6DFI stimmen die Ergebnisse nicht. Mit dieser Methode gemessene Schmelzpunkte des Duplexes haben keine feste Position in Doppelstrang und damit keine Strichehinderungen.

7.3.2 4,6-Difluorbenzimidazol-, 4,6-Difluorindol-, 7-N-Purin und 9-Deazapurin-Nukleoside

Als Grundlage für die Synthese von fluorierten Indolen waren die Ergebnisse der fluorierten Benzimidazole. Obwohl die basische Struktur sich um ein Stickstoffatom unterscheidet, es ist keine richtige Analogie zwischen den zwei Serien gefunden. Das Forschungsfeld wurde danach durch die theoretischen Ausrechnungen mit Methoden aus dem Bereich der strukturellen Bioinformatik, Molekül-dynamiksimulationen und

freie Energie-Rechnungen ausgeweitet, um diese Änderung mit physikalischen Eigenschaften zu erklären. Dadurch wurden noch zwei mögliche Nukleoside modelliert: 7-N-Purin und 9-Deazapurin. In Abbildung 7.8 sind die Werte Dipolmomente und die Elektronenverteilungen gezeigt.

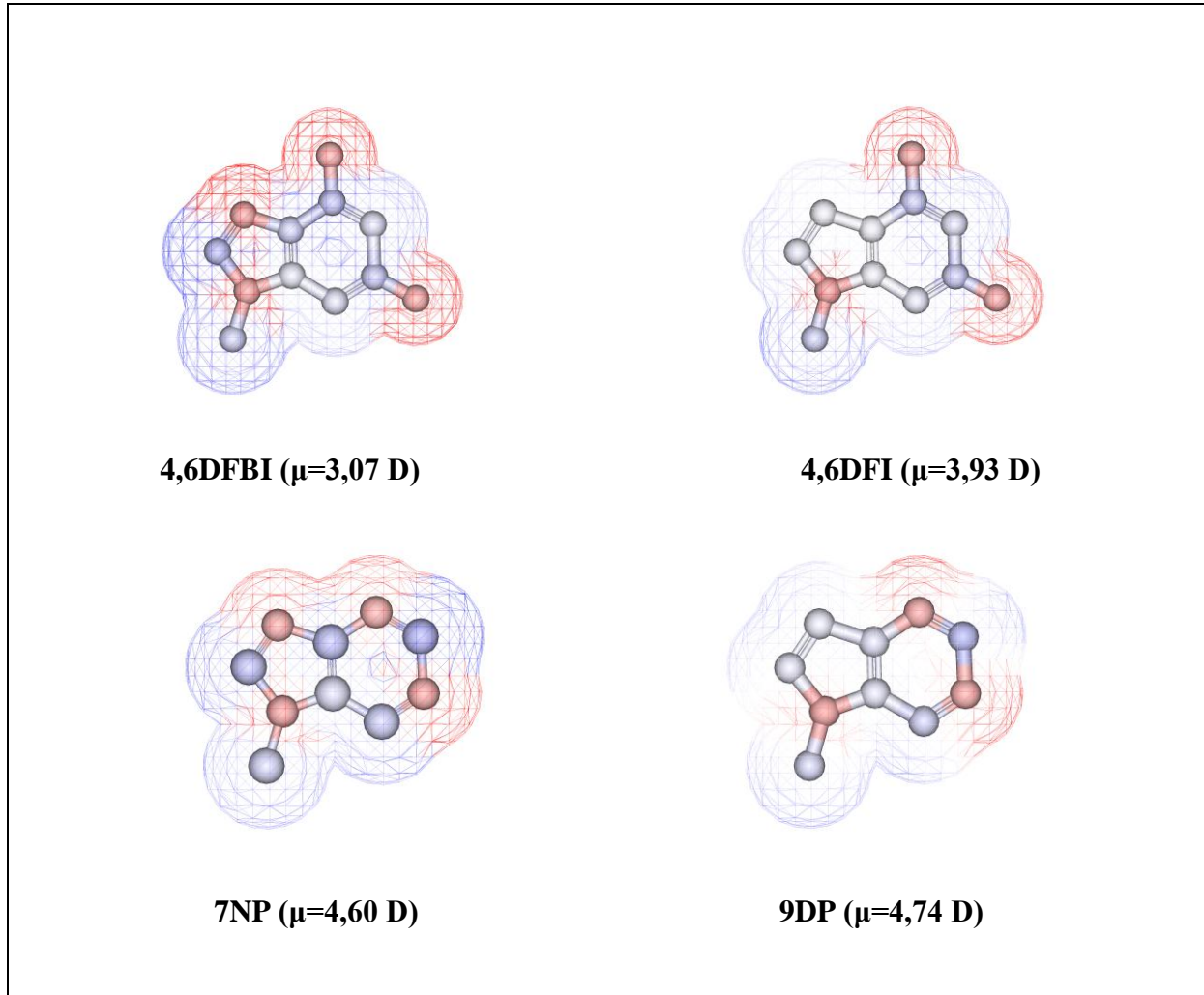


Abbildung 7.8: Ausgerechnete elektrostatisches Feld und Dipol-Momente

Beim Vergleich der ausgerechneten Dipolmomente, kann angemerkt werden, dass die Steigerung des Dipolmoments mit der Stabilität korreliert. Von den Bildern in Abbildung 7.8 für die Elektronenverteilungen man kann sehen, dass durch Entfernung einer Stickstoffatom im Fünf-Ringsystem Elektronenverteilung nicht mehr so deutlich ist.

Alle synthetisierten Modifikationen wurden danach in dieselbe 12mer-Stränge eingebaut mit allen vier natürlichen Basen gepaart und die resultierenden Schmelzpunkte der Duplexe gemessen. Alle erhaltenen Schmelzpunkte liegen unter denen der Duplexe mit natürlichen Basenpaaren. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7.5 gezeigt.

Basenpaar 1.Base	Basenpaar 2.Base	T _m [°C]	ΔH° [kcal /mol]	TΔS° [kcal/mol] (T=298K)	ΔG° [kcal/mol] (T=298K)
4,6DFBI	AS	25,2	55,1	44,6	8,4
	A	28,4	81,4	72,2	9,2
	C	28,7	81,5	72,3	9,2
	G	29,4	84,8	75,3	9,5
	U	29,3	85,3	75,8	9,5
4,6DFI	AS	25,3	67,7	59,3	8,4
	A	33,8	56,9	47,7	9,2
	C	32,0	58,3	48,9	9,4
	G	30,2	60,4	50,7	9,7
	U	29,0	72,7	63,5	9,2
7N-Purin	AS	24,7	82,9	74,8	8,1
	A	34,5	51,0	41,1	9,9
	C	32,2	58,3	48,6	9,7
	G	35,1	60,1	49,8	10,3
	U	30,8	105,1	96,0	9,1
9D-Purin	AS	24,8	65,8	57,6	8,2
	A	35,8	54,7	44,6	10,1
	C	35,0	67,5	57,1	10,4
	G	35,4	55,5	45,4	10,1
	U	33,1	95,0	85,1	9,9

Tabelle 7.5: Schmelzpunkte und thermodynamische Daten von Basenpaaren aus Basen-analogen Nukleosiden und natürlichen Nukleobasen

Die Anfangsvoraussetzung hat sich durch die Paarung mit natürlichen Basen bestätigt. Aus der Tabelle 7.5 kann man sehen, dass alle T_m-Werte der 4,6-Difluorindol-Nukleosid höher als die T_m-Werte des 4,6-Difluorbenzimidazols sind. Die T_m-Werte des 7-N-Purins sind auch höher, als die T_m-Werte des 4,6-Difluorbenzimidazols. Die Steigerungen der Werte bei dem 7-N-Purin Baustein im Vergleich mit 4,6-Difluorbenzimidazol sind ungefähr so groß, wie die Steigerungen 9-Deazapurin im Vergleich mit dem 4,6-Difluorindol Baustein.

In die Abbildung 7.9 sind die T_m-Werte graphisch vorgestellt.

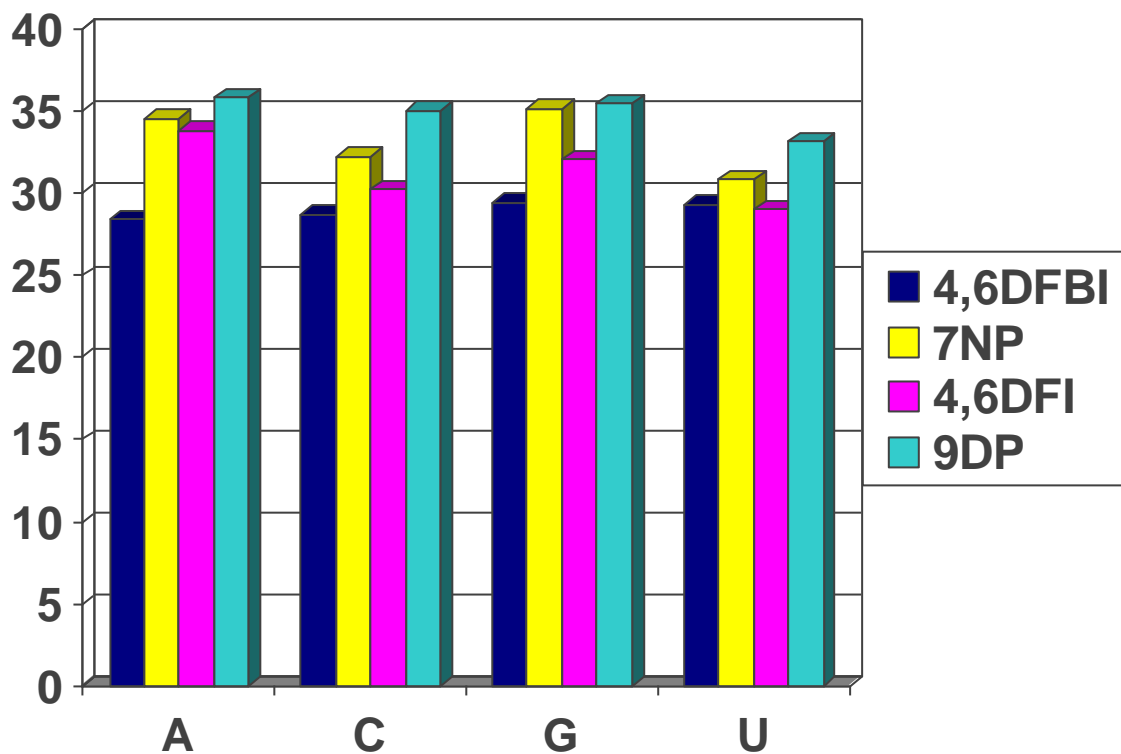


Abbildung 7.9: Graphische Vorstellung der Nukleoside bei Paarung mit natürlichen Basen

Abbildung 7.10 zeigt die normierten Schmelzkurven von RNA Duplexen mit Basenpaaren aus **A** und **4,6DFBI**, **4,6DFBI**, **7NP** und **9DP**. Es ist deutlich die geringe Schwankung der Schmelzpunkte zu erkennen.

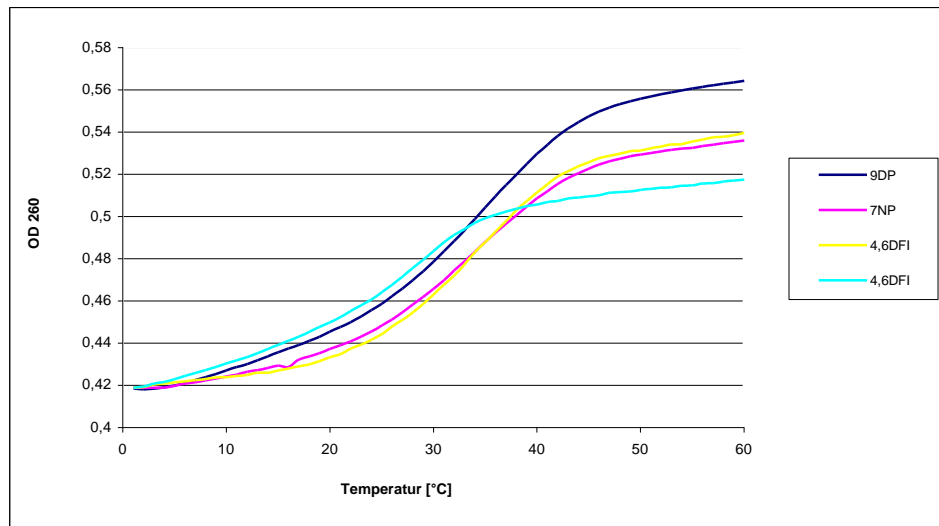


Abbildung 7.10: Schmelzkurven von RNA Duplexen mit Basenpaaren von **A** und 4,6-DFBI, 4,6-DFI, 7NP und 9DP-Nukleobasen

Aus den erreichten Schmelzpunkten der einzelnen Basenpaare wurden die Beiträge von Solvation und Basenstapelungswechselwirkungen der einzelnen Nukleosidanaloga berechnet.

Tabelle 7.6 zeigt die Beiträge von Solvation und Basenstapelungswechselwirkungen auf die Stabilität einer Doppelhelix bei Einbau der synthetisierten modifizierten Nukleoside. Die Beiträge der Modifizierten-Nukleoside beziehen sich auf einen Vergleich gegenüber Uridin.

Nukleosid	Stabilitätserhöhung durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen	Stabilitätsverlust durch geringere Solvation
4,6DFBI	2,7°C; 0,7 kcal/mol	-6,2°C; -1,3 kcal/mol
7NP	2,2°C; 0,4 kcal/mol	-4,2°C; -1,2 kcal/mol
4,6DFI	2,8,0°; 0,7 kcal/mol	-6,6°C; -1,4 kcal/mol
9DP	2,3°C; 0,5 kcal/mol	-2,6°C; -0,5 kcal/mol

Tabelle 7.6: Ausgerechnete thermodynamische Daten

Wie bei den Indolen zeigt es sich, dass alle modifizierten Nukleoside die Stabilität einer Doppelhelix durch verstärkte Basenstapelungswechselwirkungen erhöhen, durch geringere Solvation die Stabilität aber erniedrigen. Die destabilisierenden Solvationseffekte sind dabei immer größer als die stabilisierenden

Basenstapelungswechselwirkungen. Das **4,6DFI** zeigt die beste Stabilisierung durch Stacking, aber gleichzeitig die höchste Destabilisierung durch Solvatationseffekte. Den beiden Purin-Nukleoside zeigen deutlich niedrigere Solvatationseffekte, als **4,6DFBI** und **4,6DFI**.

Die Ausgerechneten Stacking-Werten für **4,6DFBI** und **7NP** unterscheiden sich um 0,1 kcal/mol. Die identische Abweichung zeigt auch **9DP** von **4,6DFI**.

7.4 Enthalpie – Entropie Kompensation

Enthalpie-Entropie-Kompensationen sind ein weit verbreitetes Phänomen in der molekularen Erkennung (Searle & Williams, 1993; Gallicchio *et al.*, 1998). Ihr Vorkommen ist von zentraler Bedeutung für sehr viele Vorgänge des Lebens, da diese reversibel sein müssen. Reversibilität bedeutet für diese Vorgänge, dass sie trotz großer Enthalpie- und Entropie-Werte eine niedrige freie Enthalpie aufweisen. Bei Nukleinsäuren tritt dies im Wechselspiel zwischen einerseits ausreichender Stabilität der Doppelhelix zur Erhaltung der Struktur und Basenabfolge und andererseits zur lokalen Öffnung der Doppelhelix aus Gründen der Replikation auf. Die Gründe, wieso die Enthalpie-Entropie-Kompensation überhaupt auftritt sind bis zum heutigen Tage nicht abschließend erforscht. Molekulare Assoziationen sind einerseits mit großen Exothermizitäten und andererseits mit einem starken Verlust an Entropie verbunden. Diese beiden sich kompensierenden Faktoren wurden in einer Studie genauer auf ihre einzelnen Bestandteile hin untersucht (Searle & Williams, 1993). Dabei wurden eine Reihe von Gleichungen zur Beschreibung der einzelnen Beiträge der Enthalpie, Entropie und Freien Enthalpie aufgestellt:

$$\Delta G_{\text{Helix}} = \Delta G_r + \Delta G_h + \Delta G_s + \Delta G_{\text{hb}}$$

$$\Delta H_{\text{Helix}} = \Delta H_r + \Delta H_h + \Delta H_s + \Delta H_{\text{hb}}$$

$$\Delta S_{\text{Helix}} = \Delta S_r + \Delta S_h + \Delta S_s + \Delta S_{\text{hb}}$$

(r = interne Rotoren, h = hydrophobe Wechselwirkungen, s = Basenstapelungswechselwirkungen, hb = Wasserstoffbrückenbindungen)

Durch die Einschränkung der freien Rotationen werden fast ausschließlich entropische Beiträge der freien Enthalpie erniedrigt, während die Enthalpie dieses Prozesses ungefähr Null bleibt. Der hydrophobe Effekt ist ebenfalls Entropie getrieben. Im Gegensatz dazu spielt die Enthalpie dabei fast keine Rolle. Umgekehrt ist die Ausbildung von Basenstapelungswechselwirkungen und Wasserstoffbrücken mit großen enthalpischen Anteilen verbunden, während hierbei entropische Anteile unbedeutend sind. Die enthalpischen Anteile beruhen in der Hauptsache auf elektrostatischen Faktoren, während die entropischen Anteile im Wesentlichen auf dynamische Phänomene zurückgeführt werden können.

Beispiele nichtkompensierender Messungen zeigen, dass Enthalpie-Entropie-Kompensationen thermodynamisch nicht erforderlich sind (Gallicchio *et al.*, 1998). Vielmehr beruhen Enthalpie-Entropie-Kompensationen auf einem bestimmten Muster molekularer Wechselwirkungen.

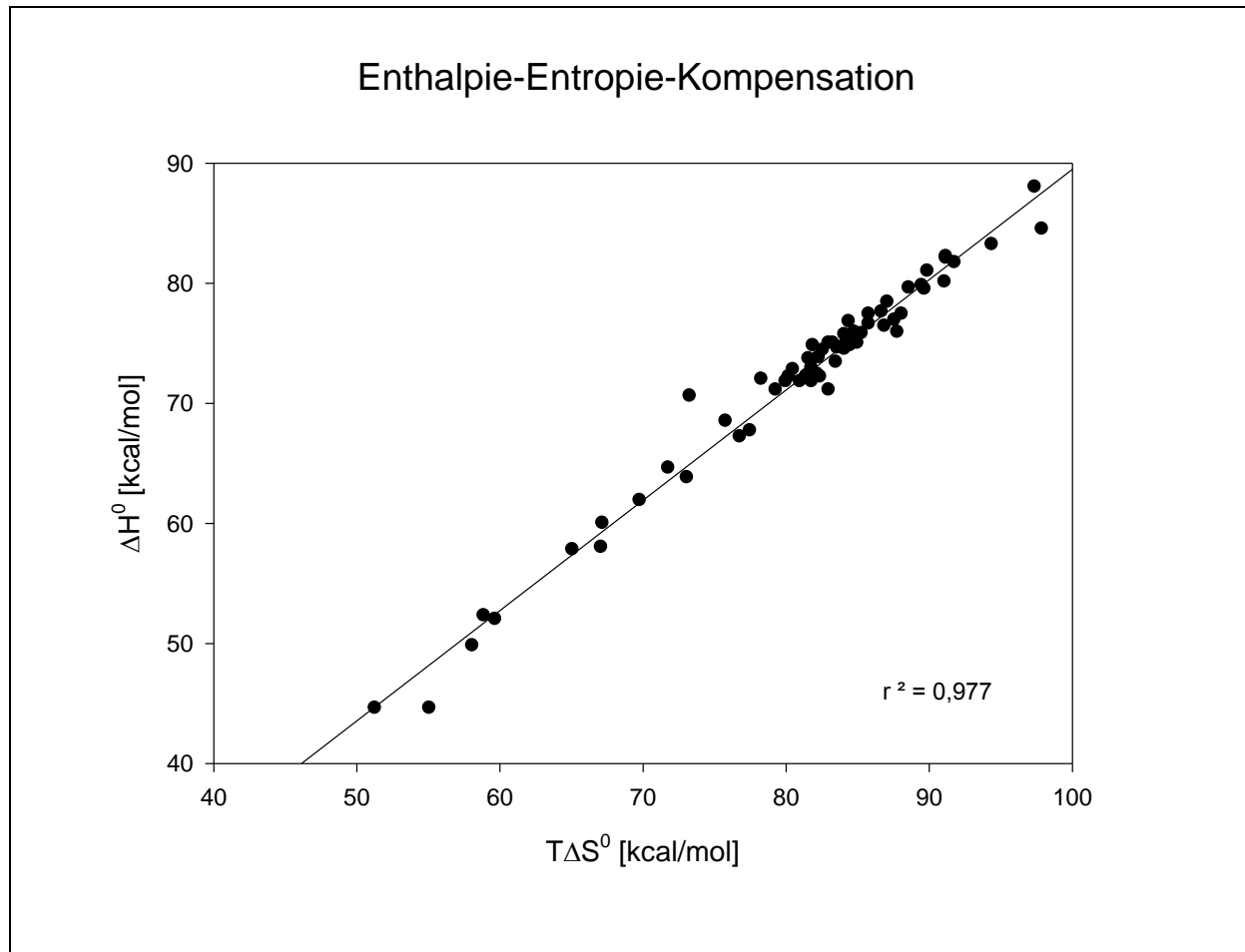


Abbildung 7.11 Enthalpie-Entropie-Kompensation von allen vermessenen einfach modifizierten RNA Duplexen

Bei allen im Rahmen dieser Arbeit vermessenen RNA Duplexen wurde ebenfalls eine Enthalpie-Entropie-Kompensation festgestellt. Abbildung 7.11 zeigt dieses Ergebnis. Die Regressionsgerade weist mit $r^2 = 0,977$ einen fast idealen Wert auf. Die Abweichungen der einzelnen Werte von der idealen Ausgleichgeraden liegen im Bereich der Fehler der UV-Messungen.

7.5 CD-spektroskopische Untersuchungen

Zur Untersuchung des Einflusses modifizierter Verbindungen auf die Struktur einer A-Helix RNA wurden die CD-Spektren der modifizierten Duplexe aufgenommen und analysiert.

Die Circular Dichroismus(CD)-Spektroskopie ist eine optische Methode zur Untersuchung der Sekundär- und Tertiärstrukturen chiraler Biomoleküle. Sie beruht auf der unterschiedlich starken Absorption von links und rechts polarisiertem Licht durch optisch aktive Substanzen. Bei dieser nicht destruktiven Meßmethode wird die wellenlängabhängige Elliptizität der Probe gemessen. Diese ist über die Intensität des rechts bzw. linkspolarisierten Lichts nach dem Absorptionsvorgang definiert und hängt über das Lambert Beer'sche Gesetz mit den Extinktionskoeffizienten der Probe zusammen. In CD-Spektren wird die Elliptizität als Funktion der Wellenlänge aufgetragen. Die resultierenden Werte werden je nach Vorzeichen als positiver bzw. negativer Cotton-Effekt bezeichnet. Der große Vorteil der CD-Spektroskopie liegt in der Empfindlichkeit der Messung gegenüber Veränderungen in der Struktur der zu untersuchenden Moleküle, der einfachen Durchführbarkeit der Messung, der geringen Probenmenge und der bereits erwähnten nicht destruktiven Natur der Messung (Gray, 1992).

Ein CD-Spektrum liefert allerdings keine genaue Strukturinformation, sondern nur ein strukturabhängiges Gesamtbild. Die Intensität und die Lage einzelner Banden kann nur im Vergleich mit Spektren bekannter Strukturen interpretiert werden. Es können jedoch zuverlässige Aussagen über die Sekundär- und Tertiärstrukturen von Nukleinsäuren gemacht werden, da die entsprechende A-, B- und Z-Form von Helices charakteristische Spektren aufweisen (Woody, 1995). Die A-Helix weist dabei ein charakteristisches Maximum bei ca. 260 nm auf und ein Minimum bei ca. 240 nm. Während sich die Form der Spektren nicht verändert, ist eine Verschiebung der Maxima und Minima um einige Nanometer möglich. Diese sind durch die Sequenzabhängigkeit der Absorption bedingt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten CD-Untersuchungen wurden an einem JASCO J-710 Spektrometer mit einem thermostatisierten Küvettenhalter

durchgeführt. Für die Messungen wurde der gleiche Puffer verwendet wie bei den UV/VIS-spektroskopischen Untersuchungen, jedoch nur ein Fünftel der Probenmenge, da für dieses Gerät kleinere Küvetten zur Verfügung standen.

Die monomodifizierten Duplexe wurden im Wellenlängenbereich von 350-210 nm untersucht. Die vergleichenden Messungen erfolgten bei 10°C, um zu gewährleisten, dass die beiden Oligonukleotid-Stränge vollständig als Duplex vorliegen. Zudem wurden die Messungen unter kontinuierlichem N₂-Strom durchgeführt, um eine Kondensation von Luftfeuchtigkeit an der Glaswand der Küvette und somit eine Störung der Messung zu unterbinden.

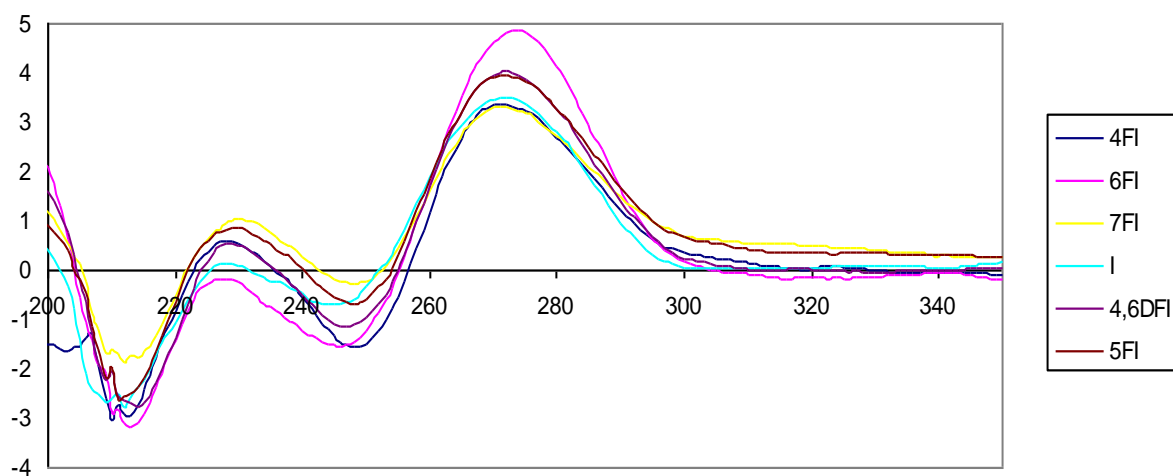


Abbildung 7.11: CD-Spektren der RNA-Duplexe mit Fluormodifizierteindolen gepaart mit A

Alle in Abbildung 7.11 gezeigten CD-Spektren zeigen den für eine A-Helix charakteristischen Kurvenverlauf. Es ist eine deutlich höhere Elliptizität der 6FI modifizierte Duplex bei dem Hauptmaximum festzustellen. Dieses Hauptmaximum zeigt, dass dieser Strang eine bessere Stabilität hat.

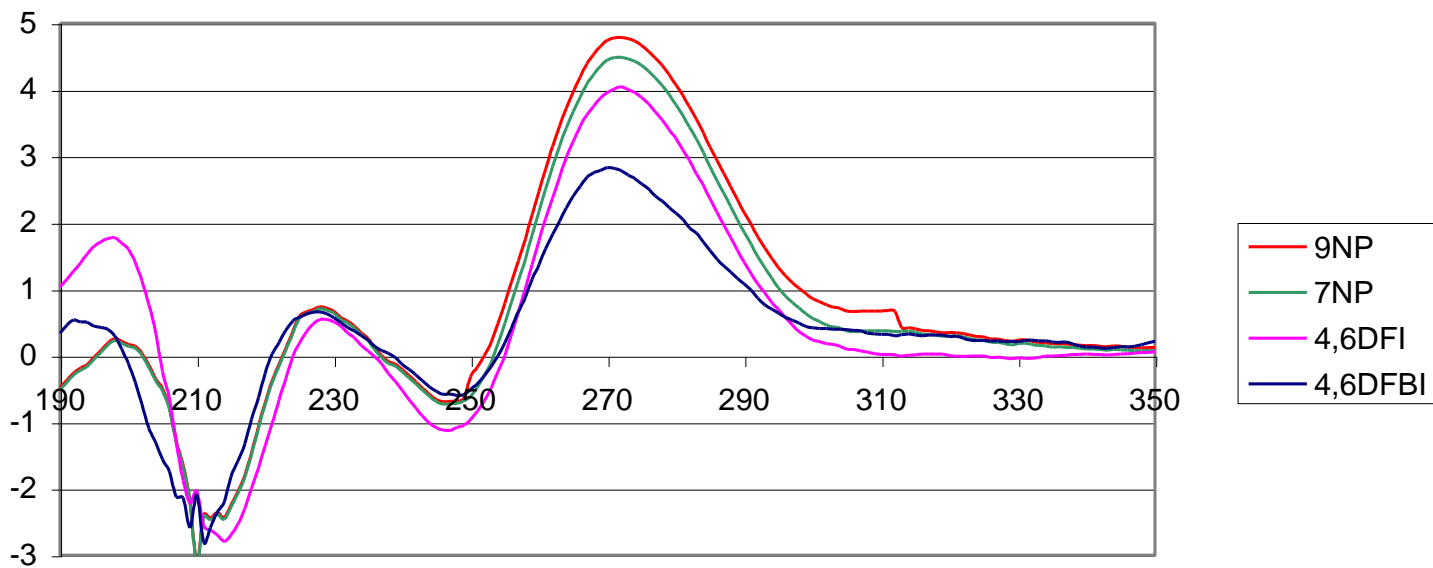


Abbildung 7.12: CD-Spektren der RNA-Duplexe gepaart zwischen **4,6DFBI**, **4,6DFI**, **7NP**, **9NP** und **A**

CD-Spektroskopische Untersuchungen wurden auch an RNA-Duplexen modifiziert mit **4,6DFBI**, **4,6DFI**, **7NP** und **9NP** und mit A hybridisiert durchgeführt.

Aus den Spektren lässt sich erkennen, dass die Hauptmaxima über die Stabilität aussagen. Eine deutlich geringere Elliptizität wurde bei 4,6DFBI gemessen, während das höchste Maximum bei 9NP ist. Diese korreliert sehr gut mit gemessenen T_m -Werten.

8 PMF Berechnungen

Aufgrund der von Parsch und Engels 2002 (Parsch, 2002) durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass 4,6-Difluorbenzimidazol (**5**) und 2,4-Difluorbenzol (**6**) zwei universale Basen mit der niedrigsten Destabilisierung des RNA 12mers und den kleinsten Energie-Unterschieden in Bezug auf die gegenüberliegende natürliche Base sind. Es wurde vermutet, dass keine typischen Wasserstoffbrücken zwischen der Fluorbase und der natürlichen Base vorliegen. Vielmehr werden schwache dipolare C-F \cdots H-X-Wechselwirkungen als stabilisierende Kraft vorgeschlagen (Parsch, 2002). Um die zugrunde liegenden stabilisierenden Kräfte der Fluorbasen bzw. deren Universalität weiter zu untersuchen, wurden „Potential of mean force“ (PMF) Berechnungen mit Hilfe von Molekulardynamik(MD)-Simulationen durchgeführt (siehe Methoden Teil). Diese untersuchten Basen-Paarungen sind in Abbildung 8.2 gezeigt. Zudem sollte geklärt werden, was der stabilisierende Beitrag der Fluorsubstituenten im Vergleich zu Toluol ist. Aufgrund der Ergebnisse dieser Berechnungen konnten neue „universelle“ Basen vorhergesagt und mit weiteren Experimenten validiert werden.

8.1 Methoden

Die Berechnungen PMF (potential of mean force) wurden mit dem AMBER8 Molekular Simulationspaket ausgeführt (Case et al, 2005). Strukturen von natürlichen Basen wurden von *nucgen* Modul AMBER übernommen und modifiziert durch Umtausch von Ribose mit Methyl-Gruppe. Ähnlich, natürliche Purin/Pyrimidin Basen wurden als Toluol, 2,4-Difluorotoluol und 4,6-Difluoro-1-methyl-benzimidazol

modifiziert. Alle Berechnungen wurden mit parm94 (Cornell et al., 1995) und gaff (Wang et al., 2004) Parameter-Set ausgeführt. Folgend RESP Methodologie (Bayly, 1993) wurde die Atomladung von natürlichen Basenanaloga bestimmt. Im der Fall natürlichen Basen, wurde die Atomladung der Methyl-Gruppe auf der glykosidische Seit allgemein neutral gerichtet, mit Atomladung der Base übernommen von AMBER Bibliothek

Nicht-natürliche Basen wurden jeweils mit A und C gepaart. Watson-Crick Basenpaargeometrie wurde durch Überlagerung auf die Struktur einer natürlichen A-Form RNA erhalten. Um die Bewegungen der Basen gestapelten Konformationen während den Simulationen zu verhindern wurden vier Bindungswinkel angelegt nach Referenz Stofer et al., 1999 und exemplarisch in Abb.8.1 gezeigt (gelbe Linien). Ähnlich, Propellerwinkel zwischen zwei Basen wurde in Order planer Konfiguration eingeschränkt (Abbildung 8.1 orange-Linien). Die Basen wurden in eine Box von TIP3P(Jorgensen et al., 1983) Wassermoleküle plazierte. Molekular Dynamik (MD) Simulationen wurden mit *sander* Modul von AMBER Programmpaket ausgeführt, mittels periodischer Randbedingungen und particle mesh Ewald method (PME) (Darden et al., 1993) um weiterräumige elektrostatische Wechselwirkungen zu bearbeiten. Alle Simulationen wurden in NVT ensemble bei 300K ausgeführt, mit Zeitschritten von 2fs. Zur Beschränkung für alle Bindungen an denen H beteiligt sind wurde der SHAKE (Ryckaert et al., 1977) Algorithmus verwendet.

PMF wurden mittels Umbrella Sampling (Torrie, 1977) berechnet. Hier wurde das System eingeschränkt auf engem Bereich der Koordinate bei Anwendung eines quadratischen Potentials $V_i(r)$. In unserem Fall der Abstand zwischen zwei Atomringen, wie das in Abb.8.1 gezeigt ist (tiefrote Linie) wurde als Reaktionskoordinate benutzt. Von beeinflusst Häufigkeitsverteilung $P_i(r)$ erhalten für jedes Intervall i , PMF $W_i(r)$ wurde Nachbearbeitung mittels WHAM erhalten (Bouzida, 1992).

$$W_i(r) = -k_B T \ln P_i(r) - V_i(r) + C_i$$

In dieser Methode sind Histogramme $P_i(r)$ kombiniert und die Faktoren C_i werden iterativ so angepasst, dass eine optimale Lösung resultiert, die die

Kontinuitätsbedingungen. erfüllt. Am Ende werden so die resultierende PMF vertikal so verschoben, dass die längsten Distanzen Null werden. Abstände r wurden von 3 bis 10 Å in 1 Å Schritte durchmustert wobei jeweils 200 ps Äquilibration vor dem eigentlichen Durchmustern von mindestens 800ps für jedes Intervall erfolgte.

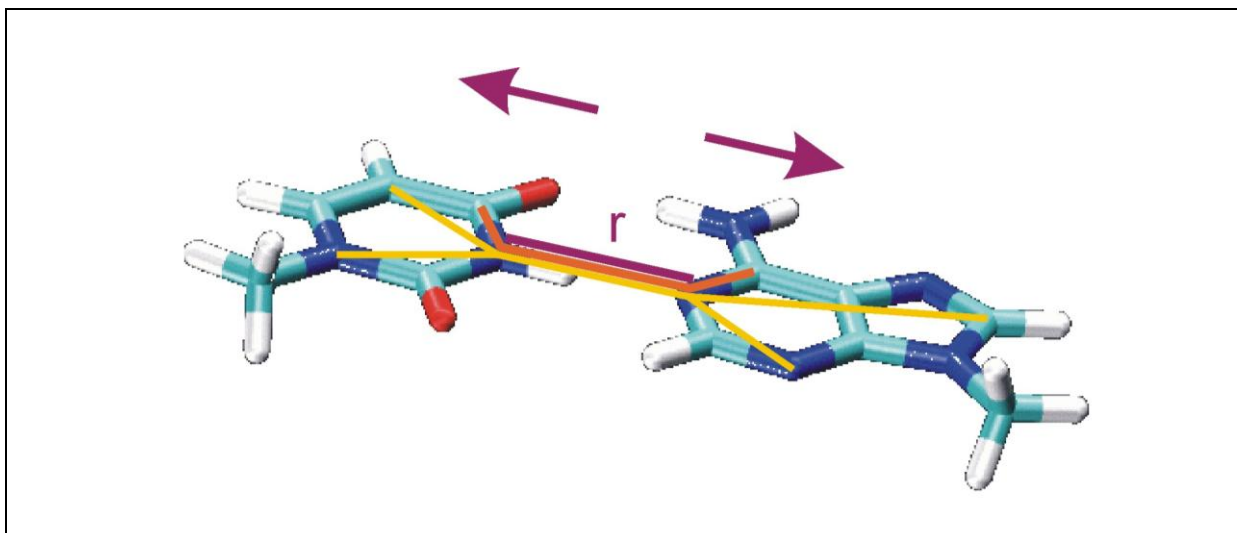


Abbildung 8.1: Abstand zwischen zwei Atomringe

8.2 Ergebnisse und Diskussion

Die freien Energie Kurven der verschiedenen Basenpaarungen der Fluorbasen 5 und 6 jeweils gegen A und C sind in Abb. 8.3 gezeigt. Alle Kurven sind bei dem maximalen simulierten Abstand zwischen den Basen auf Null gesetzt worden. Wie aufgrund des vorangegangenen Experiments (Parsch, 2002) erwartet, lassen sich anhand der Energieprofile in Abb. 8.3 keine Unterschiede in Bezug auf die gegenüberliegende Base beobachten. Der universale Charakter der Fluorbasen 5 und 6 wird in der Simulation wiedergegeben. Die Basenpaarung mit 5 bzw. 6 ist allerdings mit +0.7 kcal/mol ungünstig im Vergleich zu -3.1 kcal/mol bei dem Watson-Crick Basenpaar AU (Daten nicht gezeigt). Das erste Energieminimum der 5 bzw. 6 Basenpaare liegt auch bei einem größeren Abstand zwischen den Basen als bei AU (3.6 Å vs. 3.0 Å). Dies lässt vermuten, dass bei 5 bzw. 6 keine klassischen Wasserstoffbrücken wie bei einer Watson-Crick Basenpaarung vorliegen und möglicherweise die Desolvatation der Fluorsubstituenten ein wichtiger stabilisierender Faktor ist. Um dies genauer zu untersuchen, wurden PMF-

Berechnungen für die schwächere universale Base ohne Fluorsubstituenten (Toluen) durchgeführt.

Auch für Toluol stimmen Simulation und Experiment dahingehend überein, dass sich keine Unterschiede im Energieprofil in Bezug auf die gepaarte Base beobachten lassen (Abbildung 8.3, schwarze und orangene Kurve). Die Basenpaarung mit Toluol ist mit +1.6 kcal/mol noch ungünstiger als die mit 4,6-Difluorbenzimidazol (**5**) bzw 2,4-Difluorbenzol (**6**). Anhand der ungefähr gleichen Energie ($\sim 1.9 \pm 0.3$ kcal/mol) der

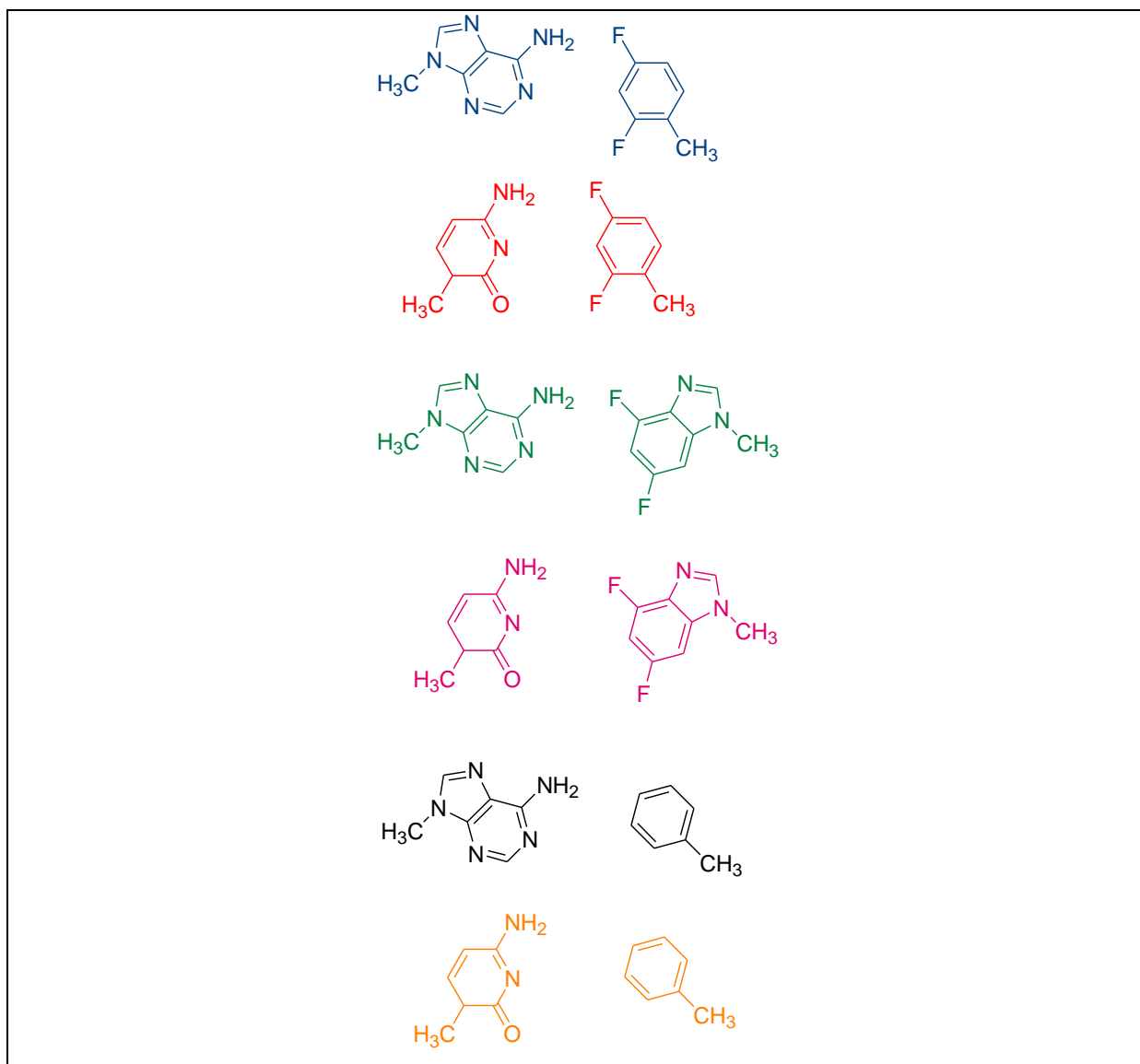


Abbildung 8.2. Mit MD untersuchte Basenpaare: A-5 (blau), C-5 (rot), A-6 (grün), C-6 (magenta), A-Toluen (schwarz) und C-Toluen (orange).

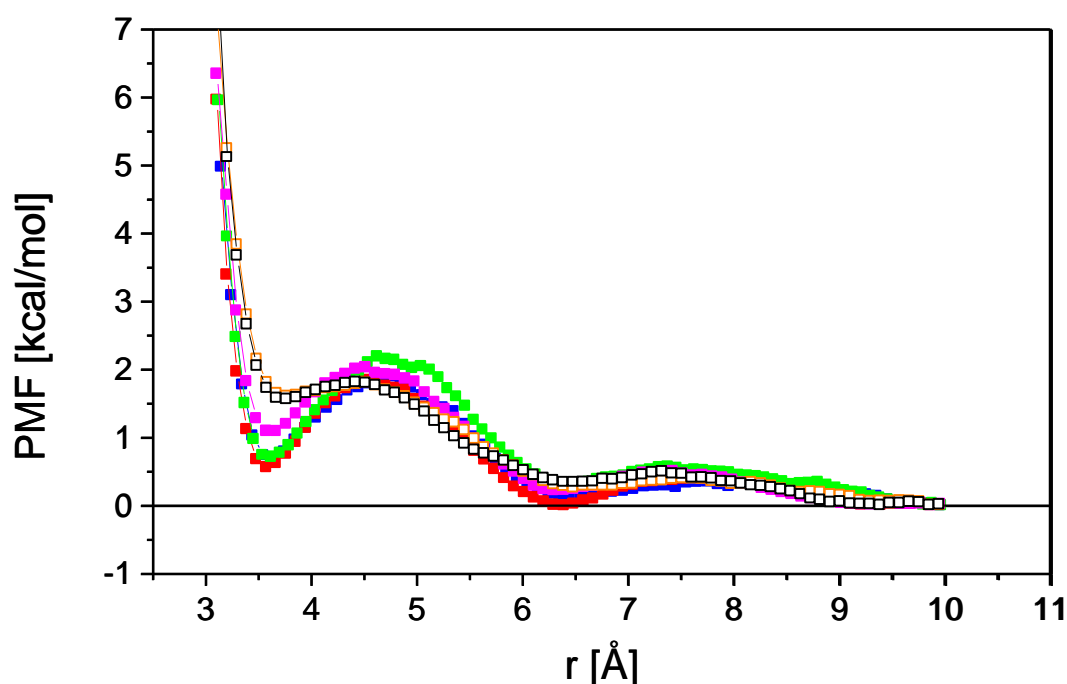


Abbildung 8.3. Freie Energie Kurve für die Basenpaare: A5 (blau), C5 (rot), A6 (grün), C6 (magenta), AToluen (schwarz) und CToluen (orange).

ersten Energiebarriere im PMF bei ca. 4.7 Å Abstand zwischen den gepaarten Basen lässt sich schließen, dass bei allen in Abb. 8.3 gezeigten Basenpaarungen der Energieaufwand gleich hoch ist, während der Annäherung zwischen den Basen sich befindendes Wasser zu verdrängen. Der Unterschied in den PMF-Werten am ersten Minimum muss also in den Interaktionen der Fluorsubstituenten in 4,6-Difluorbenzimidazol bzw. 2,4-Difluorbenzol im Vergleich zu Toluen liegen, was auf schwache, dipolare $C-F \cdots H-X$ bzw. $X \cdots H-C$ Wechselwirkungen hinweist, die schon in Referenz Justin, 2004 beschrieben wurden.

8.3 Vorhersage

Aufgrund der identifizierten Stabilitätseigenschaften der Fluorbasen B und E und unter Berücksichtigung der Bioisosterie von in Heteroaromaten befindendem Stickstoff und an einen Aromaten gebundenem Fluor wurden die ersten drei in Tabelle 8.1 aufgeführten Verbindungen als alternative universelle Basen

vorgeschlagen. Für jede der Basen wurden wieder PMFs für die Basenpaarung mit A und C berechnet. Anhand der errechneten freien Energien konnte 7-*N*-Purin als vielversprechendste universelle Base.


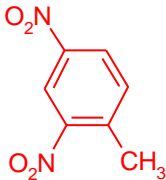
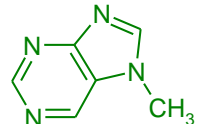
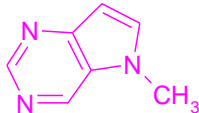
X = universale Base	ΔG für XA [kcal/mol]	ΔG für XC[kcal/mol]
	0.49	0.05
	-0.47	-0.91
	0.75	0.98
	0.80	1.05

Tabelle 8.1. Vorgeschlagene alternative „universelle“ Basen: 2,4-Dicyanotoluen (blau), 2,4-Dinitrotoluol (rot), 7-*N*-Purin (grün) und 9-Deasapurin (magenta) und die Freie Energie ΔG berechnet aus jeweiligen PMFs.

identifiziert werden (Tab. 8.1), da sie die geringsten Unterschiede in den freien Energien in Bezug auf die jeweils gepaarte Base aufweisen und die Energien in etwa im Bereich von 5 und 6 liegen. Neue Experimente wurden durchgeführt, um die vorhergesagten Eigenschaften der Purine zu validieren. Für die aus den Experimenten resultierenden potentiellen universellen Base 9-Deaza- und 7-*N*-Purin wurden ebenfalls PMF-Berechnungen durchgeführt (Tab. 8.1, letzte Zeile).

8.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aus den Simulationen berechneten relativen freien Energien für alle Basenpaarungen mit experimentellen Ergebnissen dahingehend übereinstimmen, dass sie den universellen Charakter der Basenanaloga betonen. Die universellen Basen zeigen das gleiche freie Energie Profil ungeachtet der gegenüberliegenden Base. Es konnte gezeigt werden, dass der Energieaufwand für die Desolvatisierung der Basenpaare für Toluol und 4,6-Difluorbenzimidazol, 2,4-Difluorbenzol äquivalent sind. Des Weiteren wurden schwache aber attraktive $C-F\cdots H-X$ bzw. $X\cdots H-C$ Dipolinteraktionen der Fluorbasen als ausschlaggebend für die Stabilisierung der RNA identifiziert. Im Vergleich zu Watson-Crick Basenpaaren ist die Basenpaarung mit Fluorbasen eher ungünstig. 7-*N*-Purin wurde aufgrund der durchgeführten Simulationen als potentielle universelle Base identifiziert und durch die nachfolgenden Experimente als solche bestätigt (siehe Kapitel 7). Auch die aus dem Experiment resultierende Base 9-Deazapurin wurde von den Simulationen als universelle Base bestätigt.

9 Zusammenfassung & Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden modifizierte Nukleoside synthetisiert, um ihren Einfluss auf die Stabilität von RNA-Duplexen zu untersuchen.

Bei den fluorierten Benzimidazol-Nukleosidanaloga handelt es sich um universelle Basen, die bei der Basenpaarung nicht zwischen den vier natürlichen Nukleosiden unterscheiden können. Die dabei auftretende Destabilisierung der RNA-Duplexe sollte durch die Änderung physikalisch-chemischer Eigenschaften vermindert werden. Durch die Synthese der fluorierten Indol-Nukleosidanaloga mit denselben Fluoratompositionen sollte nachgewiesen werden, welche Rolle ein ausfallendes Stickstoffatom im Fünfring-System spielt (Abbildung 9.1).

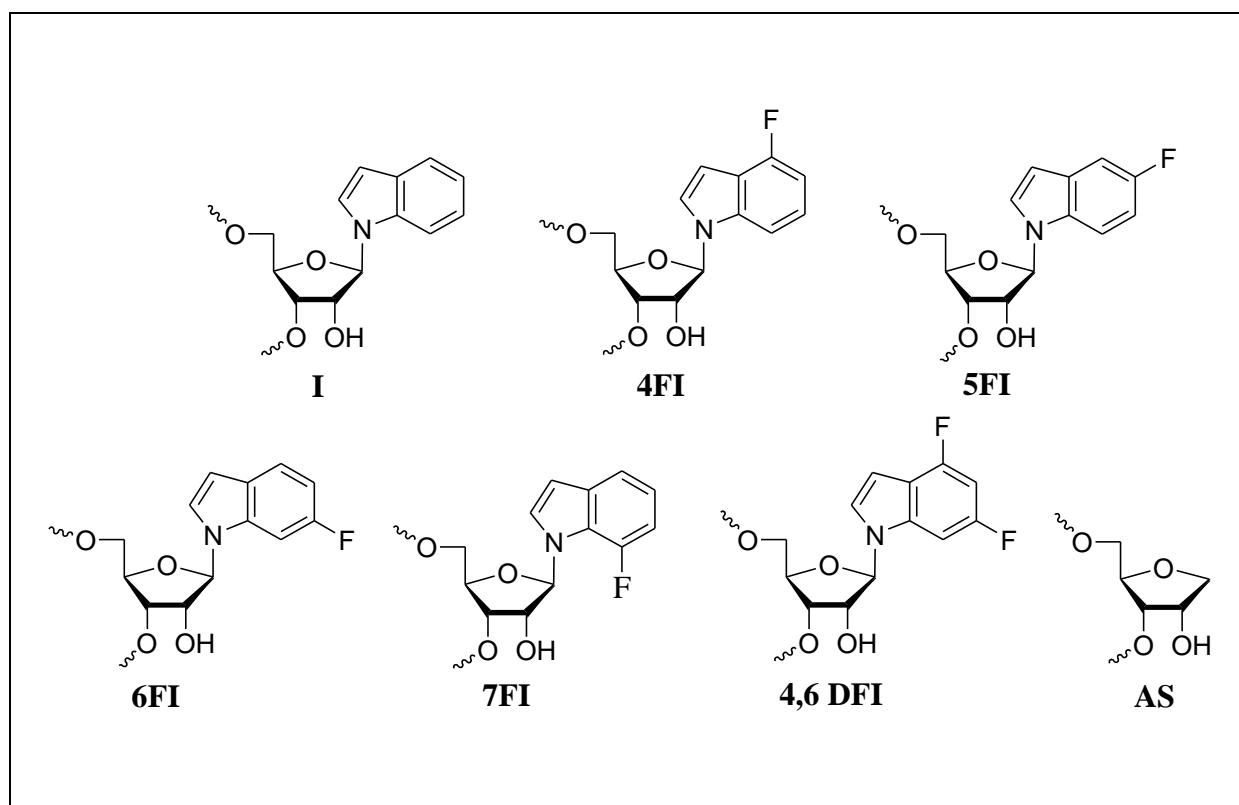


Abbildung 9.1: Synthetisierte Fluoroindol-Nukleosidanaloga

Weitere Untersuchungen wurden so entwickelt, dass die zwei spC-F in **4,6DFBI** wie auch in **4,6DFI** mit Stickstoffatomen getauscht wurden. So wurde noch eine neue Serie Nukleosidanaloga synthetisiert (Abbildung 9.2). Schließlich wurde noch 1-Desoxy-D-ribofuranose **AS** als absischer Baustein synthetisiert.

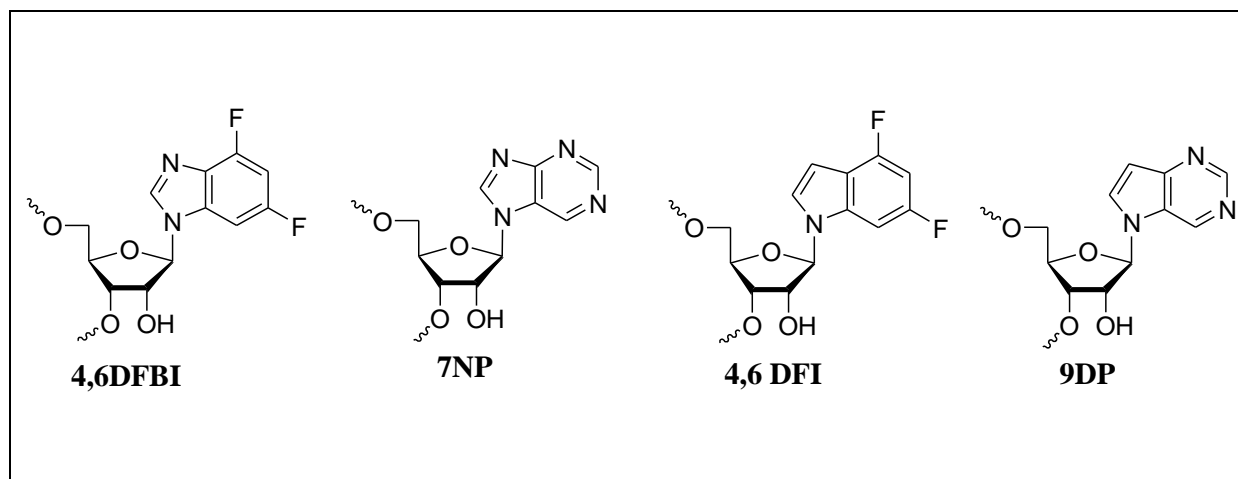


Abbildung 9.2: Synthetisierte 7-N-Purin und 9-Deazapurin-Nukleoside

Die Synthese der Indol- und 9-Deazapurin-Nukleosidanaloga wurde über eine Glycosylierungsreaktion mit geeignet geschützter Deoxyribose durchgeführt. Dies wurde über vier Stufen, ohne Aufreinigung, aus Deoxyribose synthetisiert. Die entsprechenden Deoxy-nukleoside wurden danach in fünf Schritten zu Ribonukleosiden transformiert. Nach der Entschützung von Toluoyl-Gruppen wurden die 5'- und 3'-OH Gruppen sukzessiv geschützt. Nach simultaner 5'-OH Entschützung und 3'-OMs Eliminierung, wurden die gewünschten Ribonukleoside durch katalytische Dihydroxilierung erhalten. Die Darstellung der Verbindung **7NP** erfolgte über die Silyl-Hilbert-Johnson-Reaktion. Der abasische Baustein **AS** wurde ausgehend von 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranose durch Dehydroxylierung und anschließende Entschützung erreicht.

Von allen Nukleosiden gelang es Kristalle aus Wasser oder Methanol zu erhalten und röntgenkristallographisch zu untersuchen. Die Kristallpackungen zeigten eine sehr interessante Anordnung der Moleküle. Alle Fluorindol-Nukleoside mit Ausnahme von 7-N-Purin-Nukleosid **7NP** zeigten nicht die für aromatische Systeme normale Fischgräten-Struktur, sondern eine Anordnung, in der die Moleküle gegenüberliegen. Die Kristallpackung besteht abwechselnd aus hydrophilen und lipophilen Schichten. Die hydrophilen Schichten bestehen aus den Zuckeruntereinheiten und die lipophilen

aus den Fluoraromaten. Die Zucker sind durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden. Für die Orientierung der Moleküle zueinander sind aber die Fluoratome verantwortlich. In der Kristallpackung von 7-Fluorindol-Nukleosid **7FI** kann ein Fluor-Wasserstoff-Abstand von nur 230 pm detektiert werden. Dies ist deutlich kürzer als die Summe der van-der-Waals Radien von Fluor und Wasserstoff von 2,55 Å. Der Abstand wird zwischen dem Fluor des einen Nukleosids und einem Wasserstoff eines gegenüberliegenden Nukleosids gemessen. Der Abstand von 2,30 Å ist einer der kürzesten jemals in Kristallen gemessenen F-H Abstände des Typs $C_{sp^2}-F\cdots H-C_{sp^2}$. Bedingt durch diesen kurzen Abstand kann von einer $F\cdots H$ Wasserstoffbrücke gesprochen werden. Auf der anderen Seite in der Kristallstruktur von 4-Fluorindol-Nukleosid **4FI** konnte ein F-H Abstand von 2,69 Å nachgewiesen werden, welcher deutlich länger als die Summe der van-der-Waals Radien von Fluor und Wasserstoff ist.

Die Nukleoside wurden auf ihre Lipophilie hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten der Nukleoside gemessen. Die fluorierten Nukleoside zeigten im Gegensatz zu den nichtfluorierten Nukleosiden eine deutlich größere Lipophilie.

Nach Umsetzung der Nukleoside zu den Phosphoramiditen konnten diese kupplungsfähigen Monomere in den RNA-Festphasensynthesen eingesetzt und in RNA 12mere eingebaut werden.

Um den Einfluss der aromatischen Fluorosubstitutionen auf die thermodynamische Stabilität von RNA-Duplexen zu untersuchen, wurden UV/VIS- und CD-spektroskopische Messungen an monomodifizierten RNA 12meren durchgeführt. Aus den erhaltenen Schmelzkurven wurden die Schmelzpunkte bestimmt (Abbildung 9.3) und die thermodynamischen Daten ausgerechnet.

Die Anwendung hydrophober, Fluorsubstituierter Nukleobasen führte im Fall der fluorierten Indol-Nukleoside zu Destabilisierung im Vergleich mit natürlichen Basenpaaren.

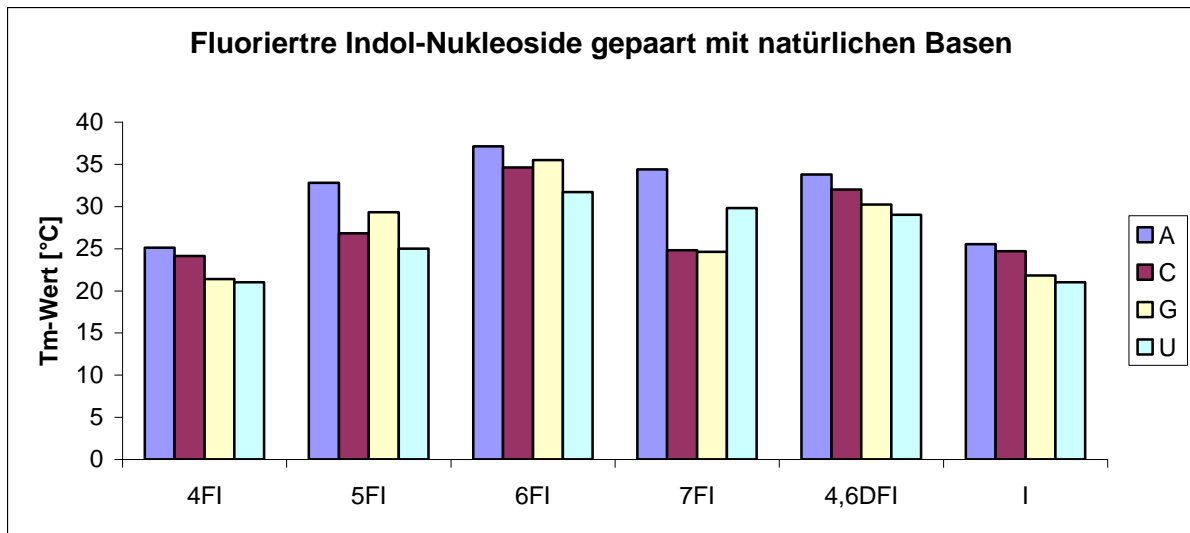


Abbildung 9.3: Graphische Darstellung der Schmelzpunkte der RNA-Duplexe

Aus den folgenden Resultaten lässt sich zusammenfassen:

1. Position der Fluoratom in fluorierten Indole spielt eine wesentliche Rolle für die Stabilität des RNA-Duplex
2. 6FI bildet die stabilste Basenpaaren mit natürlichen Basen.
3. Basenpaarung von 4FI trägt eine deutlich höhere Destabilisierung. Für diese Modifikation wurden auch die längsten Abstandswerte zwischen C-F...H in der Kristallpackung gemessen. (Die Vermutung liegt nahe, dass diese Base sich außerhalb des Duplex befindet).
4. Alle Fluorindol-Basenanaloga zeigen die Tendenz zur Paarung mit Adenosin.
5. Bei 4,6DFI handelt sich um universelle Base.

Um noch weniger destabilisierende universelle Basen zu finden, wurde das Forschungsfeld mit Methoden aus dem Bereich der strukturellen Bioinformatik, Molekül-dynamiksimulationen und freie Energie-Rechnungen ausgeweitet. Resultierende Simulationen führten zu zwei neuen Basen: **7NP** als Analogon zu **4,6DFBI** und **9DP** als Analogon zu **4,6DFI** (siehe Kapitel 8). Theoretische Rechnungen ließen sich bestätigen durch experimentelle Ergebnisse (Abbildung 9.4).

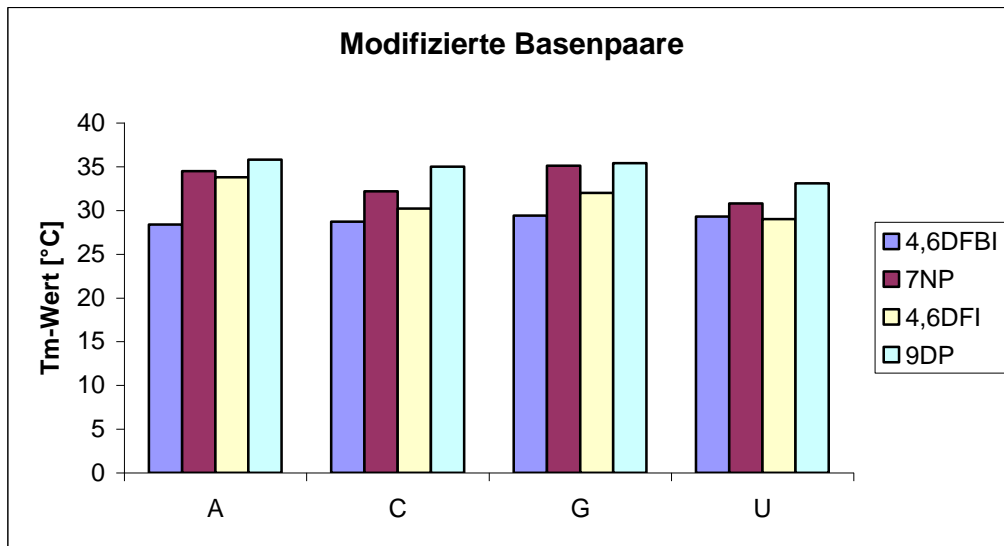


Abbildung 9.4: Graphische Darstellung der Schmelzpunkte der RNA-Duplexe

Die so entstandene Serie von Purin-Basenanaloga hat uns gezeigt, dass der Austausch von Fluoratomen durch Stickstoffatome stabilisierende Effekte bringt. Die chemischen Änderungen beeinflussen die physikalischen Eigenschaften, welche dadurch Stabilisierung oder Destabilisierung des RNA-Duuplex dirigieren. In Abbildung 9.5 befinden sich ausgerechnete Dipolmomente.

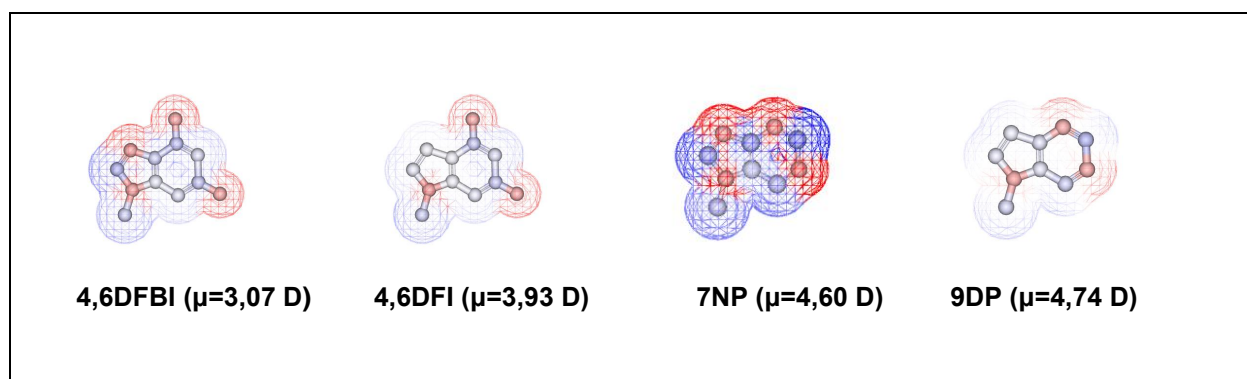


Abbildung 9.5: Ausgerechnete elektrostatisches Feld und Dipolmomente

Somit können wir für diese Serie folgendes resümieren:

- 4,6FI als universelles Base Analogon zu 4,6DFBI zeigt geringere destabilisierende Effekte auf den 12mer RNA-Duplex.
- Umtausch von Fluoratomen in den beiden Basen (4,6DFI und 4,6DFBI) resultiert in deutlich besserer Basenpaarung.
- Auserrechnete thermodynamische Parametern (von gemessenen T_m-Werten) wurde ersichtlich, dass höhere T_m-Werte durch geringere Destabilisierung aus Solvation resultieren, nicht aus erhöhten Stacking Effekten des RNA-Duplex.

Aus den in dieser Doktorarbeit gewonnenen Erkenntnissen eröffnen sich neue, interessante Arbeitsgebiete:

- Synthese der Triphosphate der modifizierten Nukleoside sowie enzymatische Einbauversuche.
- Einbau der als universellen Basen erkannten Nukleoside in Ribozyme mit Test der Enzymselektivität und Enzymaktivität.
- Der Einsatz der artifiziellen Nukleoside in der RNA Interferenz

10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeines

10.1.1 Chromatographie

Für die Chromatographie (DC, pDC und FC) wurden folgende Lösungsmittel eingesetzt:

- Acetonitril; p.a.
- Ethylacetat; technische Qualität, wurde über Calciumchlorid getrocknet und destilliert
- *n*-Hexan; technische Qualität, wurde bei Normaldruck destilliert
- Isopropanol; technische Qualität, wurde bei Normaldruck destilliert
- Methanol; technische Qualität, wurde bei Normaldruck destilliert
- Methylenchlorid; techn. Qualität, wurde über Calciumchlorid getrocknet und destilliert
- Wasser; reinst

10.1.1.a Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die analytische Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator verwendet (Merck Nr. 5554; 0,2 mm Schichtdicke), die auf eine Größe von 2 - 5 × 10 cm zugeschnitten wurden. Die Laufstrecke betrug 8 - 9 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammerfüllung ermittelt. UV-aktive Substanzen wurden mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254

nm detektiert. Dünnschichtchromatogramme mit UV-inaktiven Zuckern wurden mit einem Reagenz aus 10% konz. Essigsäure, 5% Anisaldehyd und 5% konz. Schwefelsäure in 75 %igem wässr. Ethanol bestrichen und mit einem Heißluftfön auf etwa 300°C erhitzt. Dabei färbten sich die Verbindungen schwarz.

Die Dimethoxytritylgruppe konnte durch Überleiten von Salzsäuredämpfen detektiert werden. Es erfolgte eine Orangefärbung.

10.1.1.b Präparative Dünnschichtchromatographie (pDC)

Für die präparative Dünnschichtchromatographie wurde ein Chromatotron der Firma Harrison Research (Modell 7924 T) verwendet. Als Trennmateriel diente hierbei gipshaltiges Kieselgel (Merck 60 PF₂₅₄, Nr. 7749), das in Schichtdicken von 1, 2 bzw. 4 mm auf entsprechende Glasplatten (Durchmesser 20 cm) aufgetragen wurde. Die Detektion der UV-aktiven Substanzen erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.

10.1.1.c Präparative Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie, FC)

Die Flash-Säulenchromatographie (Still *et al.*, 1978) wurde mit Kieselgel 60 (Korngröße 40-63 µm, Merck Nr. 9385) als Trennmateriel durchgeführt. Es standen Säulen verschiedener Durchmesser zur Verfügung. Die Trennungen wurden, wie bei den Einzelverbindungen in Kapitel 7 beschrieben, entweder isokratisch oder mit Stufengradienten durchgeführt.

10.1.1.d Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC Aufreinigungen der Oligonukleotide wurden auf Anlagen von JASCO durchgeführt. Details sind in Kapitel 7 beschrieben. Die Retentionszeiten der ungeschützten Nukleoside wurden ebenfalls auf der Anlage von JASCO bestimmt. Details sind in Kapitel 7 beschrieben.

10.1.2 Spektroskopie

10.1.2.a NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden auf den Geräten AMX 250, WH 270 und AMX 400 der Firma Bruker aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ (ppm) wurde auf das jeweilige Lösungsmittelsignal geeicht. Als Lösungsmittel wurden DMSO- d_6 mit $\delta = 2,49$ ppm und $CDCl_3$ mit $\delta = 7,27$ ppm für die 1H -NMR-Spektren sowie DMSO- d_6 mit $\delta = 39,5$ ppm und $CDCl_3$ mit $\delta = 77,0$ ppm für die ^{13}C -NMR-Spektren verwendet. Für die ^{19}F -NMR-Spektren in DMSO- d_6 wurde CCl_3F als Standard verwendet und auf $-162,9$ ppm geeicht. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 300 K aufgenommen.

10.1.2.b UV/VIS-Spektroskopie

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer der Firma Varian (Modell Cary 1) aufgenommen.

10.1.3 Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden auf Geräten der Firmen VG Analytical und VG Biotec (heute: Micromass) aufgenommen. Für die Electrospray-Ionisation (ESI) stand eine VG Platform II mit Quadrupol Analysator zur Verfügung. Spektren mit matrixunterstützter Laserdesorption/ Ionisation (MALDI) wurden auf einem Flugzeitmassenspektrometer (VG Tofspec) entweder im linearen oder im Reflectronmodus gemessen.

10.1.4 Elementaranalyse

Die Elementaranalysen wurden an einem Gerät der Firma Foss-Heraeus (CHN-O-Rapid) durchgeführt.

10.1.5 Verwendete Chemikalien

1,2,3,5 Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose = β -D-Ribofuranose-1,2,3,5-tetraacetat;
 $C_{13}H_{18}O_9$ [318,28]; Aldrich Nr. 15,902-6, 98 %, Smp. 81-83°C

1,2-Dichlorethan = Ethylenchlorid; $C_2H_4Cl_2$ [98,96]; Fluka Nr. 03527, puriss., absolut,
über Molekularsieb, $\geq 99,5$ %, $H_2O < 0,005$ %, Sdp. 84°C, $d = 1,253$

1-Butanol; $C_4H_{10}O$ [74,12]; Fluka Nr. 19430, purum, ≥ 98 %, Sdp. 116-118°C, $d = 0,81$

1-Methyl-2-pyrrolidinon; C_5H_9NO [99,13]; Aldrich Nr. 27,045-8, > 99 %, für die HPLC,
Sdp.^(10 mm) 81-82°C, $d = 1,028$

1-Methylimidazol; $C_4H_6N_2$ [82,11]; Fluka Nr. 67560, puriss., ≥ 99 %, Sdp. 195-197°C,
 $d = 1,033$

1-Octanol; $C_8H_{18}O$ [130,23]; Fluka Nr. 74848, für die UV-Spektroskopie, $\geq 99,5$ %, $d = 0,82$

2,4-Difluorobenzaldehyd; $C_7H_4F_2O$ [142,11]; Fluka Nr. 36886; purum., $> 97,0$ %, Sdp
65-66°C, $d=1,305$

2-Deoxy-D-*erythro*-pentose; $C_5H_{10}O_4$ [134,13]; Fluka Nr. 31170, purum, $\geq 99,0$ %

2-Fluoracetanilid; C_8H_8FNO [153,16]; Lancaster Nr. 1201, ≥ 98 %, Smp. 75-77°C

2-Fluorobenzaldehyd; C_7H_5FO [124,12]; Fluka Nr. 46550; purum., $> 98,0$ %, Sdp
172-174°C, $d=1,187$

4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid = 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (DMTrCl);
 $C_{21}H_{19}ClO_2$ [338,83]; Merck Nr. 818616, > 99 %, Smp. 120-123°C

4-Fluorobenzaldehyd; C_7H_5FO [124,12]; Fluka Nr. 46570; purum., $> 98,0$ %, Sdp
181°C, $d=1,157$

4-Fluoroindol; C_8H_6FN [135,14]; Fluorochem Nr. 005409

4-Methyl-benzoylchlorid=*p*-Toluoylchlorid; $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{COCl}$ [154,59]; Fluka Nr.76220
purum, $\geq 98,0 \%$, Sdp. 225-227°C; $d=1,169$

4-Methyl-morpholin-4-oxid-Monohydrat; $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [135,16]; Fluka Nr. 67873,
puriss., $\geq 97,0 \%$, Smp. 71-73°C

5-Fluoroindol; $\text{C}_8\text{H}_6\text{FN}$ [135,14]; Fluorochem Nr. 006240

7-Fluoroindol; $\text{C}_8\text{H}_6\text{FN}$ [135,14]; Fluorochem Nr. 005411

Acetonitril; $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ [41,05]; Fluka Nr. 00695, puriss., $\geq 99,5 \%$, absolut, über
Molekularsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 0,01 \%$, Sdp. 82°C, $d = 0,782$

Acetonitril; $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ [41,05]; Fluka Nr. 00709, puriss., $\geq 99,5 \%$, absolut, über
Molekularsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 0,001 \%$, Sdp. 82°C, $d = 0,782$ (für die Synthese der
Phosphoramidite verwendet)

Acetonitril; $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ [41,05]; Roth Nr. 8825.2, 99,5 %, für die HPLC, Sdp. 81-82°C, $d =$
0,78

Acetylchlorid; $\text{C}_2\text{H}_3\text{ClO}$ [78,50]; Fluka Nr.00990 puriss., $\geq 99,0 \%$, Sdp. 52°C; $d=1,105$

Aminomalonsäure-diethylester-hydrochlorid $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_4 \cdot \text{HCl}$ [211,65]; Fluka Nr.
08360, purum., $> 99,0 \%$, Smp 165-170°C

Ammoniak; NH_3 (g) [17,03]; Linde, eingesetzt wie gekauft

Ammoniaklösung; NH_4OH [35,05]; Merck Nr. 1.05426, 32 % reinst, $d = 0,88$

Ammoniumchlorid; NH_4Cl [53,49]; Fluka Nr. 09702, purum p.a., $\geq 99 \%$

Argon; Qualität 4.8, Linde, eingesetzt wie gekauft

Bortrifluorid-Ethyletherat; $\text{BF}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ [141,93]; Fluka Nr. 15719, purum, säurefrei,
Sdp. 128°C, $d = 1,13$

Bromessigsäure-methylester; $\text{C}_3\text{H}_5\text{BrO}_2$ [152,98]; purum., $> 97,0 \%$, Sdp 144-145°C,
 $d=1,664$

Celite-Filtergel; Fluka Nr. 22139, Filterhilfsmittel, leicht gegläht

Chloroform- d_1 ; CDCl_3 [120,37]; Deutero GmbH, 99,8 Atom % D, stabilisiert mit Silber
Cyclohexen; C_6H_{10} [82,15]; Fluka Nr. 29240, purum, $\geq 99 \%$, stabilisiert mit $\sim 0,01 \%$
2,6-Di-*tert*.-butyl-*p*-kresol, Sdp. 81-84°C, $d = 0,81$

Deuteriumoxid; D_2O ; Deutero GmbH, 99,9 Atom % D

Diethylether; $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ [74,12]; Fluka Nr. 31685, puriss., $\geq 99,5 \%$, über Molekularsieb,
stabilisiert mit 2,6-Di-*tert*.-butyl-*p*-kresol, Sdp. 35-36°C, $d = 0,713$

Diethylpyrocarbonat (DEPC); $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ [162,14]; Fluka Nr. 32490, purum, $\geq 97 \%$,
Sdp. 160-163°C, $d = 1,12$

- Diisopropylamin; $C_6H_{15}N$ [101,19]; Aldrich Nr. 47,122-4, $\geq 99,5\%$, $d = 0,722$
- Diisopropylethylamin (Hünigs Base, DIPEA); $C_8H_{19}N$ [129,25]; Aldrich Nr. D12,580-6, 99% , Sdp. $127^\circ C$, $d = 0,742$
- Dimethylsulfoxid- d_6 (DMSO- d_6); C_2D_6OS [84,13]; Groupe C. E. Saclay, $99,8\%$ Atom % D
- Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ [358,14]; Fluka Nr. 71650, puriss. p.a., kristallisiert
- Dioxan; $C_4H_8O_2$ [88,11]; Riedel-de Haën Nr. 33147, für Analyse, $\geq 99,5\%$
- Essigsäure; $C_2H_4O_2$ [60,05]; Riedel-de Haën Nr. 33209, $\geq 99,8\%$, Sdp. $117-118^\circ C$, $d = 1,049$
- Essigsäureanhydrid; $C_4H_6O_3$ [102,09]; Fluka Nr. 45830, puriss. p.a., Sdp. $138-140^\circ C$, $d = 1,08$
- Ethanol; C_2H_6O [46,07]; Riedel-de Haën Nr. 32205, für Analyse
- Formamidin-acetat; $CH_4N_2 \cdot C \cdot H_4O_2$ [104,11]; Fluka Nr. 47690, purum., $> 98,0\%$, Smp $160^\circ C$
- Indol; C_8H_7N [117,15]; Fluka Nr. 57190, puriss., $\geq 99,0\%$, Smp. $52-53^\circ C$
- Isoxasol; C_3H_3NO [69,06]; Fluka Nr. 59948, purum., $> 97,0\%$, Sdp $193-95^\circ C$, $d=1,077$
- Kaliumhydroxid; KOH [56,11]; Fluka Nr. 60370, puriss. p.a., Plätzchen, $\geq 86\%$
- Kaliumhydroxid; KOH [56,11]; Fluka Nr. 60380, purum, Pulver, $\geq 85\%$
- Kupfer; Cu [63,55]; Fluka Nr. 61141, purum $\geq 99\%$
- Lithiumchlorid; LiCl [42,39]; Fluka Nr. 62480, purum p.a.
- Magnesiumsulfat; $MgSO_4$ [120,37]; Riedel-de Haën Nr. 13143, reinst, getrocknet
- Methanol; CH_4O [32,04]; Fluka Nr. 65542, puriss., $> 99,5\%$, über Molekularsieb, $H_2O \leq 100$ ppm, Sdp. $64-65^\circ C$, $d = 0,79$
- Methanol; CH_4O [32,04]; Riedel-de Haën Nr. 32213, $> 99,8\%$, max. $0,05\%$ H_2O , Sdp. $64-65^\circ C$, $d = 0,792$
- Methansulfochlorid; CH_3ClO_2S [114,55]; puriss., $\geq 99,0\%$, Sdp $53-55^\circ C$, $d=1,476$
- Methylenchlorid = Dichlormethan; CH_2Cl_2 [84,93]; Fluka Nr. 66749; puriss., $> 99,5\%$, über Molekularsieb, $H_2O \leq 50$ ppm, Sdp. $40^\circ C$, $d = 1,325$
- Molekularsieb 3 Å; Fluka Nr. 69831
- Natrium hydrid; NaH [24,00]; Aldrich Nr. 223441, purum $\geq 95\%$, Smp. $800^\circ C$
- Natriumacetat; $C_2H_3O_2Na$ [82,03]; Acros Nr. 14961, techn. $> 95\%$
- Natriumazid; NaN_3 [65,01]; Fluka Nr. 71290; purum., $> 99,0\%$,

- Natriumcarbonat; Na_2CO_3 [105,99]; Merck Nr. 106395, mind. 99,5 %, wasserfrei
- Natriumchlorid; NaCl [58,44]; Merck Nr. 1540, > 99,5 %
- Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [156,01]; Fluka Nr. 71500, purum p.a., kristallisiert
- Natriumdithionit; $\text{Na}_2 \text{O}_4\text{S}_2$ [174,11]; Fluka Nr. 71699; purum, ~85%
- Natriumethoxid; $\text{C}_2\text{H}_5\text{ONa}$ [68,05]; Fluka Nr. 71210, techn. > 95 %
- Natriumhydrogencarbonat; NaHCO_3 [84,01]; Fluka Nr. 71630, purum, > 98 %
- Natriumhydroxid; NaOH [40,00]; Grüssing Nr. 12155, 99 %
- n*-Hexan; C_6H_{14} [86,17]; Fluka Nr. 52766, puriss., absolut, über Molekularsieb, $\text{H}_2\text{O} \leq 0,01 \%$, Sdp. 69°C , $d = 0,659$
- Palladiumhydroxid auf Kohle (Pearlman's Katalysator); Fluka Nr. 75990, puriss., $\approx 10 \%$ Palladium
- Phosphorpentoxid; P_2O_5 [141,94]; Riedel-de Haën Nr. 04113, 98,5 %
- Phosphortrichlorid; PCl_3 [137,33]; Riedel-de Haën Nr. 04603, $\geq 99 \%$, $d = 1,57$
- Pyridin; $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ [79,10]; Fluka Nr. 82704, puriss., > 99,8 %, $\text{H}_2\text{O} < 50 \text{ ppm}$, über Molekularsieb, Sdp. 116°C , $d = 0,983$
- Pyridin; $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ [79,10]; Grüssing Nr. 13057, > 99,5 %, Sdp. 115°C , $d = 0,978$, wurde mind. 2h über CaH_2 Rückfluß gekocht und abdestilliert
- Salzsäure; HCl [36,46]; Riedel-de Haën Nr. 30721, p.a., mind. 37 %
- Schwefelsäure; H_2SO_4 [98,07]; Merck Nr. 100731, 95-97 %, Sdp. 330°C , $d = 1,84$
- Silbernitrat; AgNO_3 [169,88]; Fluka Nr. 85228, puriss. p.a., $\geq 99,5 \%$
- Stickstoff; N_2 [28,01]; Qualität 99,9 %, Linde, eingesetzt wie gekauft
- Sulfurylchlorid; SO_2Cl_2 [134,97]; Aldrich Nr. 15,776-7, 97 %, Sdp. $68-70^\circ\text{C}$, $d = 1,680$
- sym.*-Collidin = 2,4,6-Trimethylpyridin; $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$ [121,18]; Fluka Nr. 27690, puriss. p.a., $\geq 99 \%$, Sdp. $170-172^\circ\text{C}$, $d = 0,914$
- tert.*-Butyldimethylchlorsilan (TBDMSCl); 1 M Lsg. in THF; $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClSi}$ [150,73]; Fluka Nr. 19904, purum, $d = 0,886$
- tert.*-Butyldiphenylchlorosilan (TBDPSCI); $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{ClSi}$ [274,87]; Fluka Nr. 19938; ; purum., > 99,5 %, Sdp 90°C , $d=1,074$
- Tetrabutylammoniumfluorid-Lsg (TBAF/THF); $\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{FN}$ [261,47]; purum~1 M Lsg. in Tetrahydrofuran; $d=0,908$
- Tetrahydrofuran; $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ [72,11]; Fluka Nr. 87371, puriss., absolut, über Molekularsieb, $\geq 99,5 \%$
- Toluol; C_7H_8 [92,14]; Fluka Nr. 89682, purum, $\geq 99 \%$, Sdp. $110-112^\circ\text{C}$, $d = 0,866$

Triethylamin (TEA); $C_6H_{15}N$ [101,19]; Fluka Nr. 90340, puriss. p.a., > 99,5 %, Sdp. 88-89°C, $d = 0,726$

Triethylamin Trihydrofluorid; $C_6H_{15}N \cdot 3HF$ [161,21]; Aldrich Nr. 34,464-8, 98 %, $d = 0,989$

Triethylsilan; $C_6H_{16}Si$ [116,28]; Fluka Nr. 90550, purum, > 97 %, Sdp. 105-110°C, $d = 0,732$

Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester (Trimethylsilyltrifluormethansulfonat, TMSTf) $C_4H_9F_3O_3SSi$ [222,26]; Fluka Nr. 91741, purum, ≥ 98 %, Sdp.^(11 mm) 39-40°C, $d = 1,225$

Wasserstoff; H_2 [2,01]; Linde, eingesetzt wie gekauft

α -D-Ribofuranose; $C_5H_{10}O_5$ [150,13]; Aldrich Nr. R175-7, 98 %

Die für die Abspaltung der Acetylschutzgruppen benötigte gesättigte ammoniakalische Methanollösung wurde durch Einleiten von NH_3 (g) in Methanol (p.a.) bei $-78^\circ C$ für 30 Minuten hergestellt. Die Lösung wurde bei $-20^\circ C$ aufbewahrt.

Für die Oligonucleotidsynthesen:

Acetonitril; for DNA-synthesis, PerSeptive Biosystems

Acetonitril; amidite diluent, PerSeptive Biosystems

Capping Reagenz, PerSeptive Biosystems

Säulen mit CPG-Trägermaterial, PerSeptive Biosystems

Deblock-Mix, PerSeptive Biosystems

Oxidizer, PerSeptive Biosystems

Phosphoramidite, PerSeptive Biosystems

Sephadex PD10 Säulen mit G25 Material, Amersham Pharmacia Biotech

10.1.6 Eingesetzte Pufferlösungen

a) Für die Anionenaustausch-HPLC:

Puffer A: DEPC-Wasser mit LiOH auf pH 8,0 eingestellt

Puffer B: Ansatz wie Puffer A und 42,39 g (1 mol) Lithiumchlorid

b) Für die Aufnahme der UV-Schmelzkurven und CD-Spektren:

Für die Aufnahme der UV-Schmelzkurven und die CD-spektroskopischen Untersuchungen der Oligonukleotide wurde folgendes Puffersystem eingesetzt: 140 mM Natriumchlorid (2,04 g NaCl), 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat (895 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (390 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Nach Auffüllen mit Wasser auf 250 ml wurde die angesetzte Lösung durch Zugabe von Salzsäure (0,1 N) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Das verwendete Wasser war mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Dazu wurde eine 0,1 %ige Lösung angesetzt, über Nacht bei RT stehen gelassen und anschließend 30 Minuten autoklaviert.

10.2 Liste der synthetisierten Verbindungen

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-4,6-difluorindol 41

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-4-fluorindol 86

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-5-fluorindol 93

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-6-fluorindol 104

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-7-fluorindol 114

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-9-deaza-purin 67

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-indol 123

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol 39

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-fluorindol 85

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-fluorindol 92

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-6-fluorindol 103

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol 40

1-(2'-Desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-7-fluorindol 113

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-indol 122

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-9-deaza-purin **66**

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-fluorindol **84**

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-fluorindol **91**

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-6-fluorindol **102**

1-(2'-Desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-7-fluorindol **112**

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-indol **121**

1-(2'-Desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-9-deaza-purin **130**

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol **38**

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-fluorindol **83**

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-fluorindol **90**

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-6-chloro-9-deaza-purin **128**

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-6-fluorindol **101**

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-7-fluorindol **111**

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-9-deaza-purin **129**

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-indol **120**

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]- 4-fluorindol **82**

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]- 6-fluorindol **100**

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]- 4,6-difluorindol **37**

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]-indol **119**

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]- 6-chloro-9-deaza-purin

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(5-methylbenzoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]- 5-fluorindol **89**

1-[2'-Desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]- 7-fluorindol **110**

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluorindolyl)- β -D-ribofuranose **42**

1'-Desoxy-1'-(5-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose **94**

1'-Desoxy-1'-(6-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose **105**

1'-Desoxy-1'-(7-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose **115**

1'-Desoxy-1'-(7-*N*-purin)- β -D-ribofuranose **48**

1'-Desoxy-1'-(9-deaza-purindolyl)- β -D-ribofuranose **68**

1'-Desoxy-1'-(indolyl)- β -D-ribofuranose **124**

1'-Desoxy-1'-(4-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose **49**

1'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(7-*N*-purin)- β -D-ribofuranose **60**

1-Desoxy-D-ribofuranose **75**

2,3,5-Tri- O-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose **74**

2',3',5'-Tri- O-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-*N*-purin)- β -D-ribofuranose **46**

2',3',5'-Tri- O-acetyl-1'-desoxy-1'-(9-*N*-purin)- β -D-ribofuranose **47**

3,5-Di-*O-p*-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranosylchlorid **36**

3,5-Di-*p*-toluoyl-1-methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid **35**

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(5-fluorinolyl)- β -D-ribofuranose **57**

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(6-fluorinolyl)- β -D-ribofuranose **58**

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorinolyl)- β -D-ribofuranose **54**

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(7-fluorinolyl)- β -D-ribofuranose **59**

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(inolyl)- β -D-ribofuranose **55**

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(7-*N*-purinolyl)- β -D-ribofuranose **63**

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(9-deazapurinolyl)- β -D-ribofuranose **72**

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorinolyl)- β -D-ribofuranose **56**

3-Amino-2-ethoxycarbonylpyrrol **30**

3*H*,5*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on **31**

3-*O*-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1-desoxy-5-*O*-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2-*O*-*tert*.-butyldimethylsilyl-D-ribofuranose **79**

4,6-Difluorindol **29**

4,6-Difluorindol-2-carbonsäure **109**

4-Fluorindol **27**

4-Fluorindol-2-carbonsäure **81**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(4,6-difluorinolyl) - β -D-ribofuranose **51**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(6-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **106**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(7-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **116**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(9-deaza-purinolyl) - β -D-ribofuranose **132**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(inolyl) - β -D-ribofuranose **125**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-*O*-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **87**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-*O*-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(5-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **96**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-*O*-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(6-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **107**

5'-*O*- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-*O*-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorinolyl) - β -D-ribofuranose **52**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (7-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **117**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (inolyl) - β -D-ribofuranose **126**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (9-deaza-purinolyl) - β -D-ribofuranose **70**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (4-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **88**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (5-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **97**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (6-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **108**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (4,6-difluorinolyl) - β -D-ribofuranose **53**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (7-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **118**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (inolyl) - β -D-ribofuranose **127**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (7-N-purinolyl) - β -D-ribofuranose **62**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'- (9-deaza-purinolyl) - β -D-ribofuranose **71**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(4-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **50**

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(5-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose **95**

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(7-N-purinolyl)- β -D-ribofuranose **61**

5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1-desoxy-D-ribofuranose **76**

5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **78**

5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose **77**

6-Chloro-9-deaza-purin **32**

6-Fluorindol **28**

6-Fluorindol-2-carbonsäure **99**

Methyl-2-azido-1-o-fluorobenzoyl-propenoat **80**

Methyl-2-azido-1-p-fluorobenzoyl-propenoat **98**

Methyl-4,6-difluorindol-carboxylat **26**

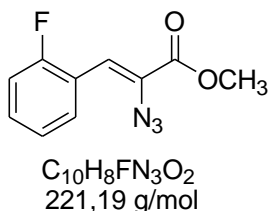
Methyl-4-fluorindol-carboxylat **24**

Methyl-6-fluorindol-carboxylat **25**

10.3 Darstellung und Eigenschaften der Einzelverbindungen

Übersicht

- Darstellung des 4-Fluoroindol-Nukleosids 49 und des entsprechenden Phosphoramidit 56
- Darstellung des 5-Fluoroindol-Nukleosids 94 und des entsprechenden Phosphoramidit 57
- Darstellung des 6-Fluoroindol-Nukleosids 105 und des entsprechenden Phosphoramidit 58
- Darstellung des 4,6-Difluoroindol-Nukleosids 51 und des entsprechenden Phosphoramidit 54
- Darstellung des 7-Fluoroindol-Nukleosids 115 und des entsprechenden Phosphoramidit 59
- Darstellung des Indol-Nukleosids 124 und des entsprechenden Phosphoramidit 55
- Darstellung des 7-*N*-Purin-Nukleosids 48 und des entsprechenden Phosphoramidit 63
- Darstellung des 9-Deaza-purin-Nukleosids 68 und des entsprechenden Phosphoramidit 72

Methyl-2-azido-1-o-fluorobenzoyl-propenoat 80

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Die Lösung aus 28,6 ml (154 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol und 60 ml abs. Methanol wurde auf -20°C abgekühlt. Eine Lösung aus 4,08 g (33 mmol) 2-Fluorobenzaldehyd und 15,5 g (135 mmol) Methylazidoacetat in 34 ml abs. Methanol wurde über 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei -20°C und über Nacht bei $+4^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde die heterogene Mischung auf Eis (ca. 200 ml) gegossen und gelassen bis Temperatur $5-10^\circ\text{C}$ wird. Der weiße Feststoff wurde abgesaugt und Filterkuchen mit Wasser gewaschen. Das Produkt muss aufgrund seiner Instabilität sofort weiter umgesetzt werden.

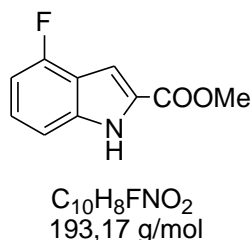
DC: $R_f=0,81$ (CH_2Cl_2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
8,23 (m, 1H, 4H); 7,47 (m, 1H, 6H); 7,34 (m, 2H, 3H, 5H); 7,00 (s, 1H, 7H); 3,88 (s, 3H, OCH_3);

ESI(+): m/z 223,8 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

El.Analyse: Berechnet: C: 54,30% H: 3,65% N: 19,00%

Gefunden: C: 54,10% H: 3,62% N: 19,00%

Methyl-4-fluorindol-carboxylat 24

Das Rohprodukt Methyl-2-azido-1-*o*-fluorobenzoyl-propenoat wurde in 200ml Xylen gelöst und zwei Mal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet. Der Ansatz wurde nun tropfenweise zu 200 ml refluxierendem Xylen gegeben. Die Reaktionsmischung wurde ca. 4 Stunden refluxiert, bis kein N_2 mehr entweicht. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

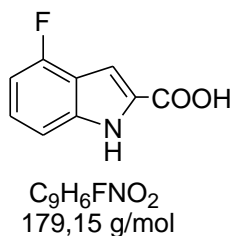
Ausbeute: 4,23g (66,7%) über zwei Schritte

DC: $R_f=0,63$ (CH_2Cl_2)

1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, $DMSO-d_6$)
12,29 (s, 1H, NH,); 7,35 (m, 2H, 6H, 7H); 7,17 (s, 1H, 3H); 6,86 (m, 1H, 5H); 3,92 (s, 3H, OCH_3)

^{13}C NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, $DMSO-d_6$)
163,18 (C=O); 162,11 (C2); 159,38 (C6); 138,03 (C8); 128,55 (C9); 124,36 (C7); 110,43 (C5); 108,75 (C3); 98,60 (C4); 52,47 (OCH_3);

ESI(+): m/z 193,8 ($M+H$)⁺

4-Fluorindol-2-carbonsäure 81

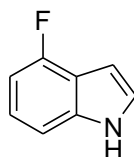
4,17 g (21,6 mmol) Methyl-6-fluorindol-2-carboxylat wurde in 350 ml 2 N NaOH-Lösung gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde auf 0°C abgekühlt und mit einer äquivalenten Menge konzentrierter Salzsäure neutralisiert. Die Lösung darf sich dabei nicht erwärmen. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten, der abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen wurde.

Ausbeute: 3,95 g (98%)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
12,09 (s, 1H, NH); 7,29-7,19 (m, 2H, 6H, 7H); 7,95 (m, 1H, 3H);
3,39 (bs, 1H, COOH);

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (235,4 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
-120,77 (m, 1F, 4F)

ESI(-): m/z 177,6 (M-H)⁻

4-Fluorindol 27

C_8H_6FN
135,14 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 2,23 g (12,5 mmol) der 4-Fluorindol-2-carbonsäure wurden in 200 ml N-Methylpyrrolidon gelöst und mit 3,17 g (50,0 mmol) Kupferpulver versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über 12 Stunden bei 240°C gekocht. Ein Argonstrom wurde langsam und kontinuierlich durchgeleitet. Anschließend wurde die Reaktionsmischung abgekühlt und über Celite filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Ether gewaschen. Das Filtrat wurde mit 500 ml Wasser versetzt und die Lösung vier Mal mit Ether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden ein Mal mit Wasser und ein Mal mit Brine gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,97 g (58 %)

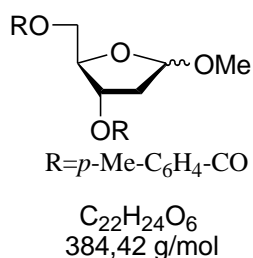
DC: $R_f=0,40$ (*n*-Hexan:EtOAc/85:15)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$)
11,41 (bs 1H, NH); 7,39 (m, 1H, 2H); 7,23 (m, 1H, 7H); 7,05 (m, 1H, 6H); 6,76 (m, 1H, 5H); 6,49 (d, 1H, 3H);

ESI(-): m/z 133,7(M-H)⁻

El.Analyse: Berechnet: C: 71,10% H: 4,48% N: 10,36%

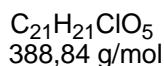
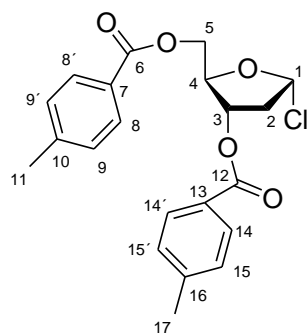
Gefunden: C: 71,38% H: 4,64% N: 10,44%

3,5-Di-*p*-toluoyl-1-methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid 35

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 9,34g 2-Desoxyribose (70mmol) wurden in 113 ml gelöst und dazu wurden 19 ml einer 1%-igen methanolischen HCl-Lösung (frisch hergestellt aus 0,34 ml Acetylchlorid in 20 ml absolutem Methanol) getropft. Die Reaktionsmischung wurde 25 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4g NaHCO₃ gequencht. Die Lösung wurde abfiltriert und zur Trockne eingengt. Der braune Sirup wurde zweimal mit Pyridin coevaporiert. Das Rohprodukt (1-Methyl-2-desoxy-D-ribose) wurde in 56 ml abs. Pyridin gelöst und auf 0°C abgekühlt. 21 ml (150 mmol) *p*-Toluoylchlorid wurden innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 150 ml Wasser versetzt und drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die organischen Extrakte wurden zwei Mal mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung, einmal mit 2N HCl und einmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Der orangefarbene Sirup wurde über Nacht im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 25,17 g (93 %) über zwei Schritte

ESI (+): 407,2 (M+Na)⁺

3,5-Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranosylchlorid 36

25,17 g (65,5 mmol) 3,5-Di-*p*-toluoyl-1-methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid wurden in 40 ml Eisessigsäure gelöst und in 60 ml einer gesättigten Lösung von HCl in Eisessigsäure (frisch vorbereitet auf einem Eisbad von: 9,8 ml Acetylchlorid und 2,4 ml Wasser in 49 ml Eisessigsäure) langsam zugetropft. Das Produkt bildete sich als weißer Niederschlag. Der Niederschlag wurde schnell abgesaugt und mit eiskaltem Ether nachgewaschen. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

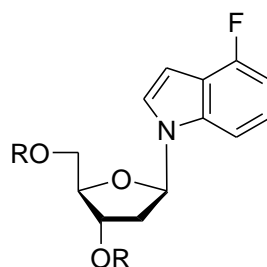
Ausbeute: 16,7g (65,5%)

^1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl_3)

7,98 (d, 2H, $J=9,0$ Hz, 8H, 14H); 7,88 (d, 2H, $J=9,0$ Hz, 8'H, 14'H);
 7,20 (d, 4H, $J=7,8$ Hz, 9H, 9'H, 15H, 15'H); 6,40 (d, 1H, $J=4,7$ Hz, 1H);
 5,50 (m, 1H, 3H); 4,81 (m, 1H, 3H); 4,69-4,50 (m, 2H, 5H);
 3,01-2,70 (m, 2H, 2H); 2,40 (s, 3H, CH_3); 2,39 (s, 3H, CH_3);

ESI(+): m/z 353,1 ($\text{M}-\text{Cl}^-$)

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)-β-D-*erythro*-pentofuranosyl]- 4-fluorindol 82



R=*p*-Me-C₆H₄-CO

C₂₉H₂₆FN₁O₅
487,52 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,84 g (6,2 mmol) 4-Fluorindol wurden in 80 ml abs. Acetonitril gelöst, mit 232 mg (9,7 mmol) NaH versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Danach wurden 2,89 g (7,44 mmol) 3,5 Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D-α-ribofuranose zugegeben und noch 20 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 gequenchet bis die Reaktionslösung neutral war. Ionenaustauscher wurde durch Celite abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 85:15. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,86 (94,4 %)

DC: R_f=0,29 (Hexan:EtOAc/ 85:15)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

7,95 (m, 4H, H_{Ar}); 7,45 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H); 7,32 -7,06 (m, 6H, H_{Ar}); 6,82 (m, 1H, 5H); 6,66 (d, 1H, J=3,4 Hz; 3H); 6,45 (pt, 1H, J_{1'H, 2'Hα}=5,6 Hz; J_{1'H, 2'Hα}=6,7 Hz; 1'H); 5,72 (m, 1H, 3'H); 4,76 (m, 2H, 5'H); 4,62 (m, 1H, 4'H); 2,89 (m, 1H, 2'H_β); 2,70 (m, 1H, 2'H_α); 2,47 (s, 3H, Ar-CH₃); 2,44 (s, 3H, Ar-CH₃);

^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, CDCl_3)

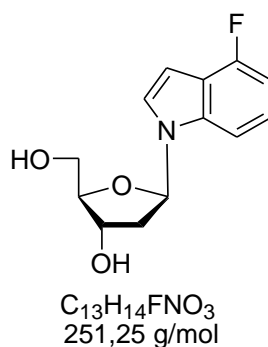
-121,79 (m, 1F, 4F);

ESI(+): m/z 510,0 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 71,46% H: 5,34% N: 2,87%

Gefunden: C: 71,19% H: 5,49% N: 3,03%

1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-fluorindol 83



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,84 g (5,83 mmol) 1-[2'-desoxy-3',5'-bis-O-(4-methylbenzoyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl]-4-fluorindol wurden in 200 ml abs. Methanol gelöst und mit 6,90 ml (37,2 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 (bis pH ca. 7) gequencht. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1,08 g (74 %)

DC: Rf=0,57 (CH_2Cl_2 / 9:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

7,64 (d, 1H, $J_{2H,3H}=3,4$ Hz; 2H); 7,43 (d, 1H, $J_{7H,6H}=8,2$ Hz, 7H); 7,12 (m, 1H, 6H); 6,83 (m, 1H, 5H); 6,57 (d, 1H, $J_{2H,3H}=3,4$ Hz; 3H); 6,37 (pt, 1H, $J_{1'H,2'H\beta}=6,2$ Hz; $J_{1'H,2'H\alpha}=7,6$ Hz; 1'H); 5,29 (d, 1H, $J=4,1$ Hz; 3'OH); 4,89 (t, 1H, $J=5,4$ Hz; 5'OH); 4,35 (m, 1H, 3'H); 3,82 (m, 1H, 4'H); 3,53 (m, 2H, 5'H); 2,47 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,41 (m, 1H, 2H $_{\alpha}$);

^{13}C NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6)
 138,28 (d, $J=44,8$ Hz; C4); 125,92 (C2); 122,21 (C6); 119,15 (C $_{Ar}$);
 117,05 (C $_{Ar}$); 106,96 (C7); 104,33 (C5); 99,13 (C3); 87,08 (C4');
 84,71 (C1'); 70,64 (C3'); 61,76 (C5'); 40,13 (C2');

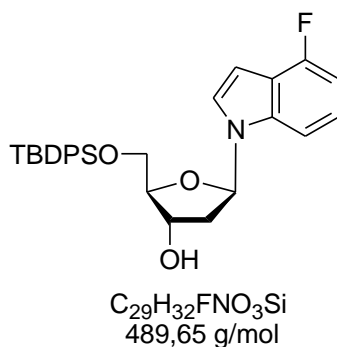
^{19}F -NMR: δ [ppm] (250,0 MHz, DMSO- d_6)
 -122,49 (m, 1F, 4F);

ESI(+): m/z 252,0 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 62,14% H: 5,62% N: 5,57%

Gefunden: C: 62,33% H: 5,80% N: 5,35%

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-fluorindol 84



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,94 g (3,75 mmol) 1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-fluorindol

wurden in 20 ml abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. 1,1 ml (4,3 mmol) *t*-Buthyldiphenylsilyl-chlorid wurde innerhalb

von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 24 dann Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt auf Kieselgel adsorbiert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1,60 g (87,4 %)

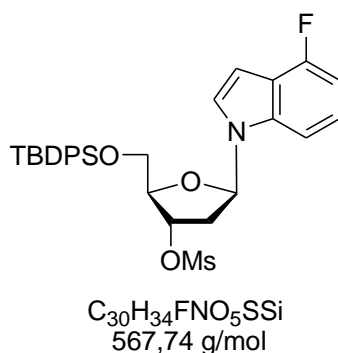
DC: Rf=0,51 (CH₂Cl₂:MeOH / 99:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
 7,59 (m, 4H, H_{Ar}); 7,52 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H); 7,39 (m, 13H, H_{Ar});
 7,08 (m, 1H, 6H); 6,83 (m, 1H, 5H); 6,50 (d, 1H, J= 3,4 Hz; 3H);
 6,41 (pt, 1H, J_{1'H,2'Hβ}=6,6 Hz; J_{1'H,2'Hα}=7,9 Hz; 1'H); 5,40 (d, 1H, J=4,5 Hz; 3'OH); 4,48 (m, 1H, 3H); 3,93 (m, 1H, 4'H); 3,72 (m, 2H, 5'H);
 2,53 (m, 1H, 2'H_β); 2,32 (m, 1H, 2'H_α); 0,98 (s, 9H, *t*-Bu);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, DMSO-*d*₆)
 -122,47 (m, 1F, 4F);

ESI(+): m/z 490,2 (M+H)⁺

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl-β-D-erythro-pentofuranosyl)-4-fluorindol 85



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,57 g (3,2 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-fluorindol wurden in 75 ml eines Gemisches aus abs. Methylenchlorid / Pyridin 4:1 gelöst. Die Reaktionslösung wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und mit 5 ml (64 mmol) MsCl versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol gequencht und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das verbleibende Öl wurde mit Methylenchlorid versetzt und ein Mal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,62 g (89%)

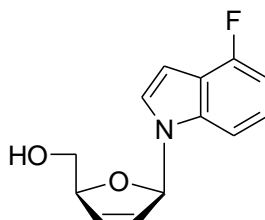
DC: R_f=0,51 (*n*-Hexan:EtOAc / 75:25)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7,74-7,12 (m, 13H, H_{Ar}); 6,82 (m, 1H, 5H); 6,59 (d, 1H, J=3,3 Hz; 3H); 6,37 (pt, 1H, J_{1'H,2'H β} =8,6 Hz; J_{1'H,2'H α} =5,5 Hz; 1'H); 5,52 (m, 1H, 3'H); 4,33 (m, 1H, 4'H); 3,88 (m, 2H, 5'H); 3,07 (s, 3H, SCH₃); 2,72 (m, 2H, 2'H); 1,12 (s, 9H, *t*-Bu);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, CDCl₃)
-121,87 (m, 1F, 4F);

ESI(+): m/z 568,3 (M+H)⁺

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-4-fluorindol 86



C₁₃H₁₂FNO₂
233,24 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,57 g (2,8 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4-fluorindol wurden in 50 ml abs. THF gelöst und mit 10,4 ml (10,4 mmol) einer 1 M *tetra*-Butylamoniumfluorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden unter Argon bei 50°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel: 1. Chloroform:Methanol/98:2; 2. Chloroform:Methanol/95:5; 3. Chloroform:Methanol/98:2. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,60 g (93 %)

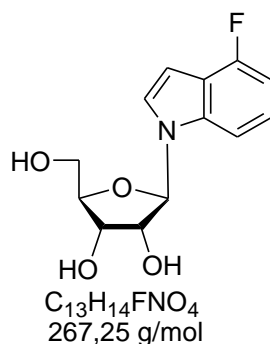
DC: R_f=0,47 (CHCl₃: MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
7,75 (d, 1H, J=4,0 Hz; 2H); 7,59 (d, 1H, J=4,6 Hz; 1'H); 7,22 (m, 2H, 6H, 7H); 6,91 (m, 1H, 5H); 6,61 (d, 1H, J=4,0 Hz; 3H); 6,55 (m, 1H, 3'H); 6,21 (m, 1H, 2'H); 4,93 (t, 1H, J=5,7 Hz; 5'OH); 4,87 (m, 1H, 4'H); 3,67 (m, 2H, 5'H);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (282,3 MHz, DMSO-*d*₆)
-122,40 (m, 1F, 4F);

ESI(+): m/z 233,8 (M+H)⁺

1'-Desoxy-1'-(4-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose 49



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,02g (4,4 mmol) 1-(2',3'-Dideoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-4-fluorindol wurden mit 1,62g (11,9 mmol) N-Methylmorpholin-4-oxid Monohydrat versetzt und in 50 ml eines Gemisches aus Aceton/Wasser im Verhältnis 8:1 gelöst. Die Lösung wurde mit 5,49 ml einer 2,5%-igen OsO₄-Lösung in *t*-Butanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml 10%-iger wässriger Na₂S₂O₄-Lösung gequencht und nochmals 15 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 100 ml Wasser versetzt und zwei Mal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,79 g (68%)

DC: R_f=0,21 (CH₂Cl₂ : MeOH/ 95:5)

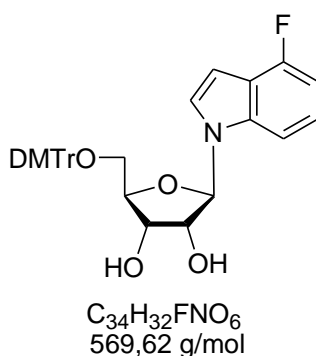
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
7,66 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H); 7,42 (d, 1H, J=8,3 Hz; 7H); 7,12 (m, 1H, 6H); 6,84 (m, 1H, 5H); 6,58 (d, 1H, J=3,3 Hz; 3H); 5,88 (d, 1H, J=6,1 Hz; 1'H); 5,34 (d, 1H, J=5,4 Hz; 2'OH); 5,14 (s, 1H, 3'OH); 5,02 (t, 1H, J=5,6 Hz; 5'OH); 4,26 (d, 1H, J=5,0 Hz; 2'H); 4,08 (m, 1H, 3'H); 3,93 (m, 1H, 4'H); 3,61 (m, 2H, 5'H);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (250,4 MHz, DMSO-*d*₆)

-122,53 (m, 1F, 4F);

ESI(-): m/z 265,7 (M-H)⁻

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(4-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose 50



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,35 g (1,31 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,27 ml (1,97 mmol) Triethylamin und 0,53 g (1,57 mmol) 4,4'- Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3ml Methanol gequencht und mit gesättigter wässriger $NaHCO_3$ -Lösung versetzt. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde zwei Mal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,42 g (75 %)

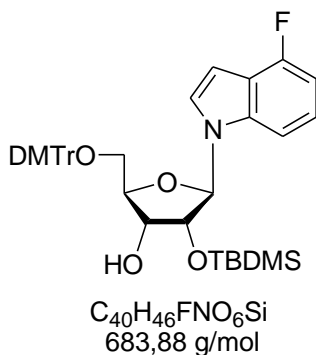
DC: Rf= 0,55 (CH_2Cl_2 :MeOH/ 95:5)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$)

7,52 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H); 7,46-6,82 (m, 16H, H_{Ar}) 6,55 (d, 1H, J=3,4 Hz; 3H); 5,92 (d, 1H, J=5,2 Hz; 1'H); 5,50 (d, 1H, J=6,1 Hz;

2'OH); 5,20 (d, 1H, J=5,6 Hz; 3'OH); 4,34 (m, 1H, 2'H); 4,15 (m, 1H, 3'H); 4,06 (m, 1H, 4'H); 3,72 (s, 6H, OCH₃); 3,23 (m, 2H, 5'H);
¹⁹F-NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, DMSO-*d*₆)
 -122,39 (m, 1F, 4F);
 ESI(+): m/z 570,4 (M+H)⁺

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorinolyl) -β-D-ribofuranose 87



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,42 g (0,74 mmol) 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(4-fluorinolyl) -β-D-ribofuranose wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 151 mg (0,89 mmol) Silbernitrat und 1,04 ml (1,04 mmol) einer 1 M *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zwei Mal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über

semipräp. HPLC (MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel, *n*-Hexan:EtOAc/1:5).
Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,16 g (31 %)

DC: R_f=0,54 (*n*-Hexan:Ethylacetat /4:1)

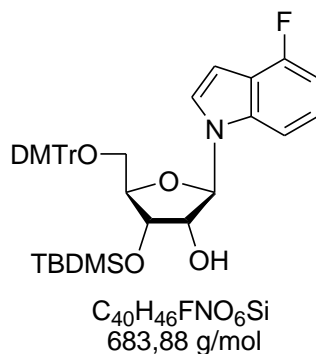
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
7,54 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H); 7,47-6,81 (m, 16H, H_{Ar}); 6,59 (d, 1H, J=3,4 Hz; 3H); 5,95 (d, 1H, J=6,2 Hz; 1'H); 5,11 (d, 1H, J=5,2 Hz; 3'OH); 4,49 (m, H, 2'H); 4,11 (m, 2H, 4'H, 3'H); 3,74 (s, 6H, OCH₃); 3,30 (m, 2H, 5'H); 0,71 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0,13 (s, 3H, SiCH₃); -0,27 (s, 3H, SiCH₃);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,61 MHz, DMSO-*d*₆)
158,10 (d, J=41,4 Hz; C₄); 144,34 (DMTr); 142,17 (DMTr); 136,14 (DMTr); 135,80 (DMTr); 130,25 (C_{Ar}); 128,29 (DMTr); 127,21 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 125,80 (DMTr); 124,26 (DMTr); 122,00 (C_{Ar}); 116,61 (C_{Ar}); 113,16 (C_{Ar}); 108,80 (C_{Ar}); 103,00 (C_{Ar}); 99,88 (DMTr); 86,22 (C1'); 76,12 (C4'); 72,25 (C2'); 70,70 (C3'); 126,58 (C7); 125,27 (C8); 121,38 (C6); 108,10 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1'); 84,88 (C4'); 73,90 (C2'); 70,21 (C3'); 64,42 (C5'); 55,47 (OCH₃); 26,10 (SiC(CH₃)₃); 18,34 (SiC(CH₃)₃); -4,03 (SiCH₃); -5,06 (SiCH₃);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, DMSO-*d*₆)
-122,33 (m, 1F, 4F);

ESI(+): m/z 684,34 (M+H)⁺

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (4-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose 88



5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (4-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt (*fast-Isomer*) bei der Synthese von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (6-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose.

Ausbeute: 0,15g (30 %)

DC: R_f= 0,51 (*n*-Hexan :Ethylacetat /4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
 7,57 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H); 7,48-6,83 (m, 16H, H_{Ar}); 6,57 (d, 1H, J=3,4 Hz; 3H); 5,90 (d, 1H, J=5,4 Hz; 1'H); 5,39 (d, 1H, J=6,3 Hz; 2'OH); 4,28 (m, H, 2'H); 4,03 (m, 2H, 4'H, 3'H); 3,72 (s, 6H, OCH₃); 3,15 (m, 2H, 5'H); 0,81 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0,05 (s, 3H, SiCH₃); -0,01 (s, 3H, SiCH₃);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,9 MHz, DMSO-*d*₆)
 158,10 (d, J=39,4 Hz; C₄); 144,62 (DMTr); 144,84 (DMTr); 138,91 (DMTr); 135,29 (DMTr); 130,05 (C_{Ar}); 128,79 (DMTr); 127,20 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 126,17 (DMTr); 122,26 (DMTr); 122,02 (C_{Ar}); 118,01 (C_{Ar}); 117,20 (C_{Ar}); 115,80 (C_{Ar}); 113,90 (C_{Ar}); 99,88 (

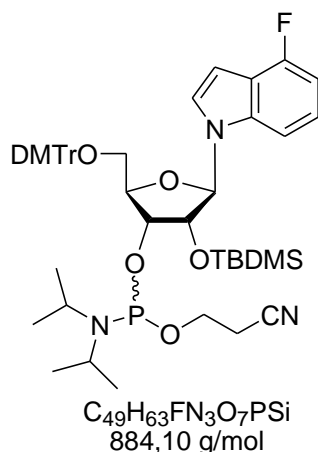
DMTr); 86,22 (C1'); 76,12 (C4'); 72,25 (C2'); 70,70 (C3'); 126, 58 (C7); 125,27 (C8); 121,38 (C6); 108,10 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1'); 84,88 (C4'); 73,28 (C2'); 71,85 (C3'); 63,04 (C5'); 55,07 (OCH₃); 25,73 (SiC(CH₃)₃), 17,34 (SiC(CH₃)₃); -4,03 (SiCH₃); -5,01 (SiCH₃);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (250,4 MHz, DMSO-*d*₆)

-122,34 (m, 1F, 4F);

ESI(+): m/z 684,68 (M+H)⁺

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose 56



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 160 mg (0,234 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 520 μl (3,9 mmol) *sym*. Collidin und 14 μl (0,18 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 78 μl (0,35 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei

Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO_3 -Lösung gequenchet. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:EtOAc/ 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 150 mg (73 %)

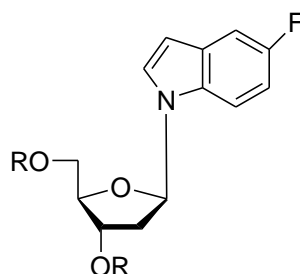
DC: $R_f=0,41; 0,32$ (*n*-Hexan:EtOAc/ 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 7,41-6,53 (m, 36H, H_{Ar}); 5,91 (d, $J=7,8$ Hz ; 2H, 1' H); 4,62 (m, 2H, 3' H); 4,20 (m, 2H, 2' H); 3,73; 3,71 (s, 12H, OCH_3); 3,51 (m, 6H, 5' H, CH_2CN); 3,23 (m, 2H, 3' H); 2,62 (m, 4H, OCH_2); 1,18 (m, 12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0,78; 0,75 (m, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -0,22; -0,24; -0,46; -0,48 (s, 12H, SiCH_3);

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
 150,81 und 148,92 (Verhältnis 1: 4,6);

ESI(+): m/z 905,05 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(5-methylbenzoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]- 5-fluorindol 89



$\text{R}=\text{p-Me-C}_6\text{H}_4\text{-CO}$

$\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{FNO}_5$
 487,52 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,00 g (7,4 mmol) 5-Fluorindol wurden in 80 ml abs. Acetonitril gelöst, mit 266 mg (11,1 mmol) NaH versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Danach wurden 3,46 g (8,9 mmol) 3,5 Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranose zugegeben und noch 20 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde gequenchet durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 bis die Reaktionslösung neutral ist. Ionenaustauscher wurde durch Celite abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 85:15. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 3,35 (93 %)

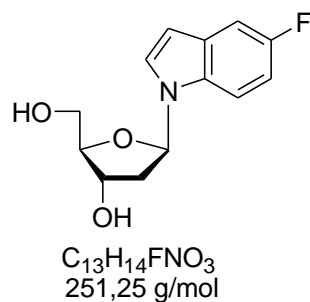
DC: Rf=0,35 (Hexan:EtOAc/ 85:15)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8,00 (d, 2H, $J=8,0$ Hz; *o*-Tol-H); 7,91 (d, 2H, $J=8,0$ Hz; *o'*-Tol-H);
7,86 (m, 2H, H_{Ar}); 7,37 (m, 5H, H_{Ar} ,) 6,92 (ddd, 1H, $J_{6H,7H}=8,9$ Hz;
 $J_{6H,5H}=11,0$ Hz; $J_{6H,4H}=2,1$ Hz; 6H); 6,59 (pt, 1H, $J_{1'H,2'H\beta}=6,1$ Hz; $J_{1'H,2'H\alpha}=6,8$ Hz; 1'H); 6,53 (d, 1H, $J=3,1$ Hz; 2H); 5,71 (m, 1H, 3'H);
4,61 (m, 1H, 4'H); 4,52 (m, 2H, 5'H); 2,95 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,70 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$); 2,46 (s, 3H, Ar-CH $_3$); 2,39 (s, 3H, Ar-CH $_3$);

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (235,4 MHz, CDCl_3)
-124,11 (m, 1F, 5F);

ESI(+): m/z 509,8 (M+Na) $^+$

El.Analyse: Berechnet: C: 71,45% H: 5,38% N: 2,87%
Gefunden: C: 71,22% H: 5,50% N: 2,65%

1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-5-fluorindol 90

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 3,20 g (6,57 mmol) 1-[2'-desoxy-3',5'-bis-O-(4-methylbenzoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]- 5-fluorindol wurden in 250 ml abs. Methanol gelöst und mit 7,78 ml (42,0 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 (bis PH ca. 7) gequencht. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1,61 g (92 %)

DC: Rf=0,56 (CH₂Cl₂ / 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

7,90 (d, 1H, $J_{2H,3H}$ =3,2 Hz; 2H); 7,71 (m, 1H, 7H); 7,35 (m, 1H, 4H); 7,03 (d, 1H, $J_{6H,7H}$ =8,7 Hz; $J_{6H,4H}$ =2,1 Hz; $J_{6H,5H}$ =10,2 Hz; 6H); 6,54 (d, 1H, $J_{2H,3H}$ =3,2 Hz; 3H); 6,40 (pt, 1H, $J_{1'H,2'H\beta}$ =6,3 Hz; $J_{1'H,2'H\alpha}$ =6,9 Hz; 1'H); 5,32 (d, 1H, J =4,1 Hz; 3'OH); 4,92 (t, 1H, J = 5,2 Hz; 5'OH); 4,40 (m, 1H, 3'H); 3,86 (m, 1H, 4'H); 3,57 (m, 2H, 5'H); 2,57 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,28 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (282,3 MHz, DMSO-*d*₆)

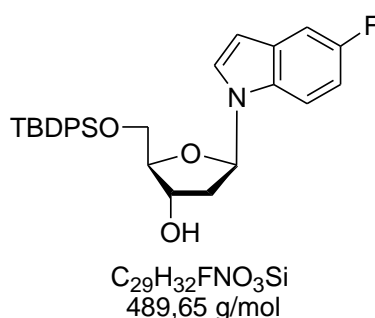
-124,53 (m, 1F, 5F);

ESI(-): m/z 249,8 (M-H)⁻

El.Analyse: Berechnet: C: 62,14% H: 5,62% N: 5,57%

Gefunden: C: 62,32% H: 5,78% N: 5,45%

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-fluorindol 91



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,60 g (6,4 mmol) 1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-fluorindol wurden in 25 ml abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. 1,9 ml (7,3 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-chlorid wurde innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt auf Kieselgel adsorbiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 2,68 g (86,0 %)

DC: R_f=0,23 (*n*-Hexan:EtOAc/ 4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

8,62 (d, 1H, J=3,1 Hz; 2H); 7,50 (m, 12H, H_{Ar}); 6,95 (ddd, 1H, J_{6H,7H}=8,6 Hz, J_{6H,4H}=2,1 Hz, J_{6H,5H}=10,1 Hz; 6H); 6,45 (m, 2H, 2H, 1'H

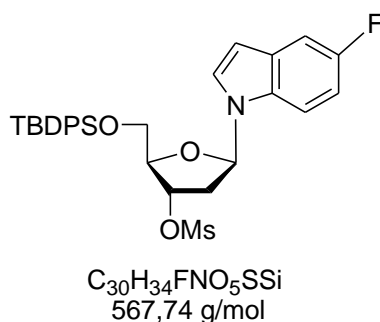
); 5,44 (d, 1H, J=4,2 Hz; 3'OH); 4,53 (m, 1H, 3'H); 4,05 (m, 1H, 4'H); 3,85 (m, 2H, 5'H); 2,60 (m, 1H, 2'H_β); 2,38 (m, 1H, 2'H_α); 1,04 (s, 9H, *t*-Bu);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (283,3 MHz, DMSO-*d*₆)

-124,76 (m, 1F, 5F);

ESI(-): m/z 489,1 (M-H)⁻

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-fluorindol 92



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 2,80 g (5,7 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldiphenylsilyl-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-fluorindol wurden in 150 ml eines Gemisches aus abs. Methylenchlorid / Pyridin 4:1 gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und mit 8,9 ml (114 mmol) MsCl versetzt. Die Reaktionsmischung wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol gequencht und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das verbleibende Öl wurde mit Methylenchlorid versetzt und einmal mit Wasser extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,89 g (89%)

DC: R_f=0,20 (*n*-Hexan:EtOAc / 4:1)

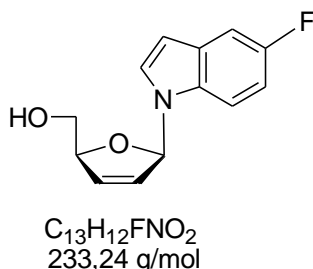
¹H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, CDCl₃)
 7,55 (m, 4H, H_{Ar}) 7,38-7,15 (m, 9H, H_{Ar}); 6,84 (m, 1H, 6H); 6,37 (d, 1H, J=3,0 Hz; 3H); 6,24 (pt, 1H, J_{1'H,2'Hβ}=7,2 Hz; J_{1'H,2'Hα}=6,2 Hz; 1'H); 5,43 (m, 1H, 3'H); 4,23 (m, 1H, 4'H); 3,71 (m, 2H, 5'H); 2,98 (s, 3H, SCH₃); 2,61 (m, 2H, 2'H); 1,05 (s, 9H, *t*-Bu);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (282,3 MHz, CDCl₃)
 -124,40 (m, 1F, 5F);

ESI(+): m/z 567,9 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 63,47% H: 6,04% N: 2,47%
 Gefunden: C: 63,36% H: 6,20% N: 2,39%

1-(2',3'-Didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-5-fluorindol 93



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,90 g (3,3 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-5-fluorindol wurden in 60 ml abs. THF gelöst und mit 12,2 (12,2 mmol) einer 1 M *tetra*-Butylamoniumfluorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden unter Argon bei 50°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel: 1.Chloroform:Methanol/98:2; 2. Chloroform:Methanol/95:5; 3. Chloroform:Methanol/98:2. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,73 g (93 %)

DC: $R_f=0,46$ (CHCl_3 : MeOH/ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

7,70 (m, 1H, 6H); 7,42 (d, 1H, $J=3,6$ Hz; 1'H); 7,33 (m, 1H, 2H);
7,03 (m, 2H, 7H, 3'H); 6,52 (m, 2H, 4H, 2'H); 6,15 (d, 1H, $J=3,1$ Hz;
3H); 4,86 (t, 1H, $J=5,4$ Hz; 5'OH); 4,80 (m, 1H, 4'H); 3,55 (m, 2H,
5'H);

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (282,3 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

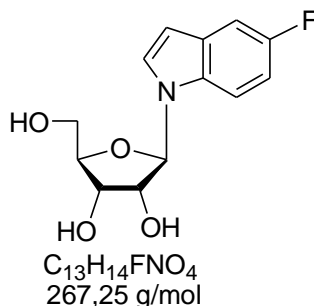
-124,44 (m, 1F, 5F);

ESI(+): m/z 233,7 ($\text{M}+\text{H}^+$)

El.Analyse: Berechnet: C: 66,94% H: 5,19% N: 6,01%

Gefunden: C: 66,80% H: 5,49% N: 5,83%

1'-Desoxy-1'-(5-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose 94



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,42 g (1,8 mmol) 1-(2',3'-Didesoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-5-fluorindol wurde mit 0,67 g (4,9 mmol) N-Methylmorpholin-4-oxid Monohydrat versetzt und in 30 ml eines Gemisches aus Aceton/Wasser 8:1 gelöst. Die Lösung wurde mit 2,26 ml einer 2,5%-igen OsO_4 -Lösung in *t*-Butanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml 10%-iger wässriger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung gequencht und noch 15 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 70 ml Wasser versetzt und zweimal mit 150 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte

durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,25 g (52%)

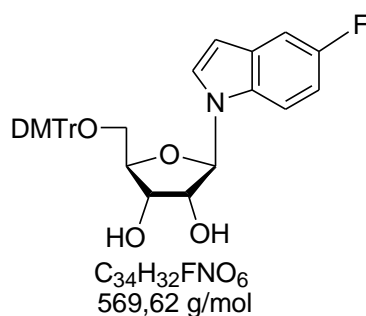
DC: R_f=0,21 (*n*-Hexan:EtOAc / 1:2)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
 7,70 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H); 7,40 (d, 1H, J=8,1 Hz; 7H); 7,12 (m, 1H, 6H); 6,84 (m, 1H, 4H); 6,52 (d, 1H, J=3,4 Hz; 3H); 5,78 (d, 1H, J=6,2 Hz; 1'H); 5,30 (d, 1H, J=5,4 Hz; 2'OH); 5,18 (s, 1H, 3'OH); 5,04 (t, 1H, J=5,6 Hz; 5'OH); 4,36 (d, 1H, J=5,0 Hz; 2'H); 4,09 (m, 1H, 3'H); 3,91 (m, 1H, 4'H); 3,62 (m, 2H, 5'H);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (250,4 MHz, DMSO-*d*₆)
 -124,54 (m, 1F, 4F);

ESI(-): m/z 265,7 (M-H)⁻

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(5-fluorindolyl) -β-D-ribofuranose 95



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,35 g (1,31 mmol) 1'-Desoxy-1'-(5-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose wurde in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,27 ml (1,97 mmol) Triethylamin und 0,53 g (1,57 mmol) 4,4'- Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion

durch Zugabe von 3 ml Methanol gequenchet und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,54 g (72 %)

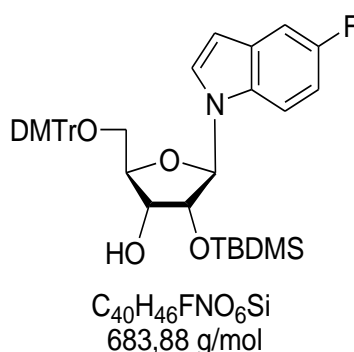
DC: $R_f = 0,45$ (CH_2Cl_2 :MeOH/ 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 7,61 (m, 1H, H_{Ar}); 7,59 (d, 1H, $J=3,0$ Hz; 2H); 7,40-7,22 (m, 11H, H_{Ar}); 6,83 (m, 4H, H_{Ar}); 6,49 (d, 1H, $J=3,0$ Hz; 3H); 5,91 (d, 1H, $J=6,0$ Hz; 1'H); 5,49 (d, 1H, $J=6,2$ Hz; 3'OH); 5,18 (d, 1H, $J=6,4$ Hz; 2'OH); 4,35 (m, 1H, 2'H); 4,28 (m, 1H, 3'H); 4,07 (m, 1H, 4'H); 3,73 (s, 6H, OCH_3); 3,22 (m, 2H, 5'H);

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (282,3 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 -124,55 (m, 1F, 5F);

ESI(+): m/z 570,2 ($\text{M}+\text{H}^+$)

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (5-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose 96



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,5 g (0,9 mmol) 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(5-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und

mit 187 mg (1,1 mmol) Silbernitrat und 1,3 ml (1,3 mmol) einer 1 M *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel, *n*-Hexan:MeOAc/10:1,8). Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,19 g (32 %)

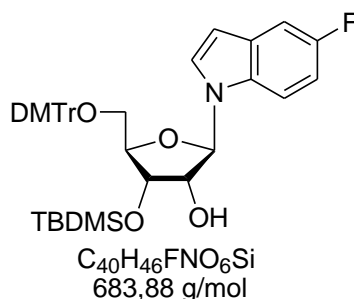
DC: R_f=0,41 (*n*-Hexan :Ethylacetat /4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
7,73 (m, 2H, H_{Ar}); 7,55-7,39 (m, 11H, H_{Ar}); 6,91 (m, 4H, H_{Ar}); 6,89 (d, 1H, J=3,1 Hz; 3H); 6,04 (d, 1H, J=6,2 Hz; 1'H); 5,13 (d, 1H, J=5,7 Hz; 3'OH); 4,60 (m, H, 2'H); 4,27 (m, 2H, 4'H, 3'H); 3,78 (s, 6H, OCH₃); 3,42 (m, 2H, 5'H); 1,28 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 1,03 (s, 3H, SiCH₃); 0,99 (s, 3H, SiCH₃);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (283,3 MHz, DMSO-*d*₆)
-124,37 (m, 1F, 5F)

ESI(+): m/z 684,0 (M+H)⁺

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (5-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose 97



5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (6-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt (*fast-Isomer*) bei der Synthese von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (5-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose.

Ausbeute: 0,18g (30 %)

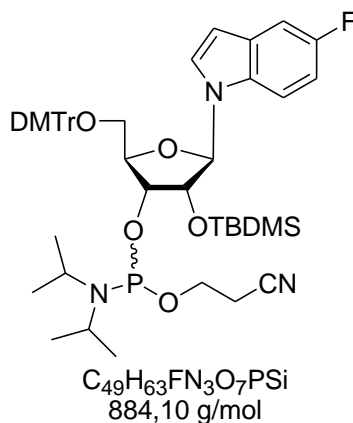
DC: R_f= 0,39 (*n*-Hexan:Ethylacetat /4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
 7,50 (m, 2H, H_{Ar}); 7,37-7,17 (m, 11H, H_{Ar}); 6,80 (m, 4H, H_{Ar}); 6,45 (d, 1H, J=3,1 Hz; 3H); 5,85 (d, 1H, J=6,1 Hz; 1'H); 5,23 (d, 1H, J=5,6 Hz; 2'OH); 4,29 (m, H, 2'H); 4,23 (m, 1H, 3'H); 3,96 (m, 1H, 4'H,); 3,68 (s, 6H, OCH₃); 3,27 (m, 2H, 5'H); 0,77 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); - 0,18 (s, 3H, SiCH₃); -0,33 (s, 3H, SiCH₃);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (283,3 MHz, DMSO-*d*₆)
 -124,32 (m, 1F, 5F)

ESI(+): m/z 684,2 (M+H)⁺

**3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-
Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(5-
fluorindolyl)- β -D-ribofuranose 57**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 160 mg (0,234 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(5-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 520 μ l (3,9 mmol) *sym.* Collidin und 14 μ l (0,18 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 78 μ l (0,35 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:EtOAc/ 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 147 mg (71 %)

DC: R_f=0,38/0,42(*n*-Hexan:EtOAc/ 4:1)

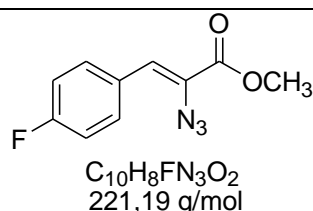
¹H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, CDCl₃)

7,66-7,37 (m, 28H, H_{Ar}); 7,00 (m, 8H, H_{Ar}); 6,11 (d, $J=7,6$ Hz ; 2H, 1' H); 4,44 (m, 2H, 3' H); 4,07 (m, 2H, 2' H); 3,95; 3,91 (s, 12H, OCH_3); 3,48 (m, 6H, 5' H, CH_2CN); 2,85 (m, 2H, 4' H); 2,70 (m, 4H, OCH_2); 1,36 (m, 12H, $CH(CH_3)_2$); 0,90; 0,85 (m, 18H, $SiC(CH_3)_3$); 0,24; -0,01; -0,23; -0,26 (s, 12H, $SiCH_3$);

^{31}P -NMR: δ [ppm] (300 MHz, $CDCl_3$)
151,41 und 148,63 (Verhältnis 1: 3,7)

MALDI: m/z 908,3 ($M+Na$)⁺

Methyl-2-azido-1-*p*-fluorobenzoyl-propenoat 98



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Die Lösung aus 28,6 ml (154 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol und 60 ml abs. Methanol wurde auf $-20^\circ C$ abgekühlt. Eine Lösung aus 4,08 g (33 mmol) 4-Fluorbenzaldehyd und 15,5 g (135 mmol) Methylazidoacetat in 34 ml abs. Methanol wurde über 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden bei $-20^\circ C$ und über Nacht bei $+4^\circ C$ gerührt. Anschließend wurde die heterogene Mischung auf Eis (ca. 200ml) gegossen, bis sie eine Temperatur von $5-10^\circ C$ erreichte. Der weiße Feststoff wurde abgesaugt und der Filterkuchen mit Wasser gewaschen. Das Produkt musste aufgrund seiner Instabilität sofort weiter umgesetzt werden.

DC: $R_f=0,81$ (CH_2Cl_2)

1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, $DMSO-d_6$)
7,95 (m, 2H, 2H, 6H); 7,26 (m, 2H, 3H, 2H); 6,95 (s, 1H, 7H); 3,86 (s, 3H, OCH_3);

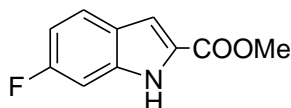
^{13}C NMR: 164,23 ($C=O$); 160,27 (C8); 132,82 (C2); 132,68 (C6); 129,40 (C1); 124,80 (C4); 123,35 (C7); 115,70 (C3); 115,36 (C5); 53,01 (OCH_3)

^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

-110,71 (s, 1F, *p*-F);

ESI(+): m/z 242,1 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺

Methyl-6-fluorindol-carboxylat 25



$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FNO}_2$
193,17 g/mol

Das Rohprodukt Methyl-2-azido-1-*p*-fluorobenzoyl-propenoat wurde in 200ml Xylen gelöst und zwei Mal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet. Der Ansatz wurde nun tropfenweise zu 200 ml refluxierendem Xylen gegeben. Die Reaktionsmischung wurde ca. vier Stunden gekocht, bis sich das N_2 nicht mehr entwickelte. Anschließend wurde es am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 4,67g (73,5%) über zwei Schritte

DC: $R_f=0,68$ (CH_2Cl_2)

^1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

11,99 (s, 1H, NH,); 7,69 (dd, 1H, $J=5,52$ Hz; $J=8,82$; 7H); 7,16 (m, 2H, 3H, 4H); 6,96 (m, 1H, 5H); 3,87 (s, 3H, OCH_3);

^{13}C NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

163,18 (C=O); 162,11 (C2); 159,38 (C6); 138,03 (C8); 128,55 (C9); 124,36 (C7); 110,43 (C5); 108,75 (C3); 98,60 (C4); 52,47 (OCH_3);

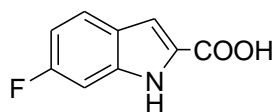
^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

-117,22 (m, 1F, 6F);

ESI(-): m/z 191,6 ($\text{M}+\text{H}$)⁻

El.Analyse: Berechnet: C: 62,17% H: 4,14% N: 7,52%

Gefunden: C: 62,06% H: 4,06% N: 7,46%

6-Fluorindol-2-carbonsäure 99

$C_9H_6FNO_2$
179,15 g/mol

4,62 g (24,2 mmol) Methyl-6-fluorindol-2-carboxylat wurden in 350 ml 2 N NaOH-Lösung gelöst. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Reaktionslösung wurde auf 0°C abgekühlt und neutralisiert mit einer äquivalenten Menge konzentrierter Salzsäure. Die Lösung durfte sich dabei nicht erwärmen. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten, der abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen wurde.

Ausbeute: 4,29g (99%)

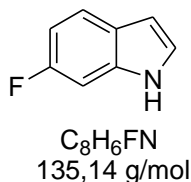
DC: $R_f=0,33$ (CH_2Cl_2 :MeOH / 95:5)

1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO- d_6)
12,97 (bs, 1H, COOH); 11,80 (s, 1H, NH); 7,66 (dd, 1H, $J_{4H,5H}=8,8$ Hz, $J_{4H,6F}=5,5$ Hz, 4H); 7,12 (m, 2H, 3H, 7H); 6,51 (ddd, 1H, $J_{4H,5H}=8,8$ Hz, $J_{5H,6F}=9,7$ Hz, $J_{7H,5H}=2,5$ Hz, 5H);

^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, DMSO- d_6)

-117,86 (m, 1F, 6F);

ESI(-): m/z 179,8 ($M+H$)⁻

6-Fluorindol 28

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 3,45 g (19,3 mmol) 6-Fluorindol-2-carbonsäure wurden in 250 ml N-Methylpyrrolidon gelöst und mit 4,9 g (77,2 mmol) Kupferpulver versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über 12 Stunden bei 240°C refluxiert. Ein Argonstrom wurde langsam und kontinuierlich durchgeleitet. Anschließend wurde die Reaktionsmischung abgekühlt und über Celite filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Ether gewaschen. Das Filtrat wurde mit 500 ml Wasser versetzt und die Lösung vier Mal mit Ether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden einmal mit Wasser und einmal mit Brine gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,10 (81%)

DC: $R_f=0,38$ (*n*-Hexan:EtOAc/85:15)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
8,12 (bs 1H, NH); 7,59 (d, 1H, $J_{2\text{H},3\text{H}}=3,3$ Hz, 2H); 7,18 (dd, 1H, $J_{4\text{H},5\text{H}}=8,7$ Hz, $J_{4\text{H},6\text{F}}=5,6$ Hz, 4H); 7,07 (dd, 1H, $J_{7\text{H},5\text{H}}=2,2$ Hz, $J_{7\text{H},6\text{F}}=10,2$ Hz, 7H); 6,90 (ddd, 1H, $J_{4\text{H},5\text{H}}=8,7$ Hz, $J_{5\text{H},7\text{H}}=2,2$ Hz, $J_{5\text{H},6\text{F}}=10,1$ Hz, 5H); 6,54 (d, 1H, $J_{2\text{H},3\text{H}}=3,3$ Hz, 3H);

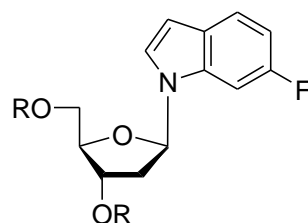
$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (235,4 MHz, CDCl_3)
-121,83 (m, 1F, 6F);

ESI(-): m/z 121,8 ($\text{M}+\text{H}^-$)

El.Analyse: Berechnet: C: 71,11% H: 4,44% N: 10,37%

Gefunden: C: 71,20% H: 4,42% N: 10,50%

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]- 6-fluorindol 100



R=*p*-Me-C₆H₄-CO

C₂₉H₂₆FNO₅
487,52 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,55g (11,5 mmol) 6-Fluorindol wurden in 150 ml abs. Acetonitril gelöst, mit 415 mg (17,3 mmol) NaH versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Danach wurden 5,36 g (13,8 mmol) 3,5 Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranose zugegeben und nochmals 20 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde gequencht durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 bis die Reaktionslösung neutral ist. Ionenaustauscher wurde durch Celite abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 85:15. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 5,20 (93 %)

DC: R_f=0,30 (Hexan:EtOAc/ 85:15)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

8,05 (d, 2H, J=8,2 Hz, *o*-Tol-H); 7,96 (d, 2H, J=8,2 Hz; *o'*-Tol-H);
7,59 (d, 1H, J_{2H,3H}=3,3 Hz, 2H); 7,37 (dd, 1H, J_{7H,6F}=10,2 Hz,
J_{7H,5H}=2,1 Hz, 7H); 7,30 (d, 2H, J=8,0 Hz, *m*-Tol-H); 7,26 (d, 2H,
J=8,0 Hz, *m'*-Tol-H); 6,93 (ddd, 1H, J_{4H,5H}=8,8 Hz, J_{5H,7H}=2,05 Hz,
J_{5H,6F}=10,05 Hz, 5H); 6,59 (d, 1H, J_{2H,3H}=3,3 Hz, 3H); 6,41 (pt, 1H,
J_{1'H,2'H}=6,0 Hz, J_{1'H,2'Ha}=7,2 Hz, 1'H); 5,74 (m, 1H, 3'H); 4,67 (m,

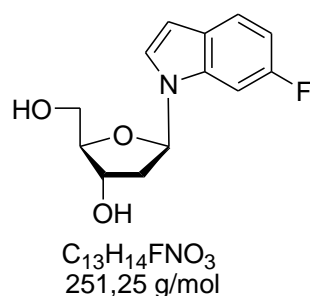
2H, 5'H); 4,61 (m, 1H, 4'H); 2,88 (m, 1H, 2'H_β); 2,69 (m, 1H, 2'H_α);
 2,49 (s, 3H, Ar-CH₃); 2,45 (s, 3H, Ar-CH₃);

ESI(+): m/z 488,8 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 71,46% H: 5,34% N: 2,87%

Gefunden: C: 71,42% H: 5,53% N: 3,08%

1-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-6-fluorindol 101



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,60g (5,34 mmol) 1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O- (4-methylbenzoyl)-β -D- *erythro*-pentofuranosyl]- 6-fluorindol wurden in 200 ml abs. Methanol gelöst und mit 6,31 ml (34,1 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 (bis PH ca. 7) gequencht. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1,27 g (95 %)

DC: R_f=0,57 (CH₂Cl₂ / 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

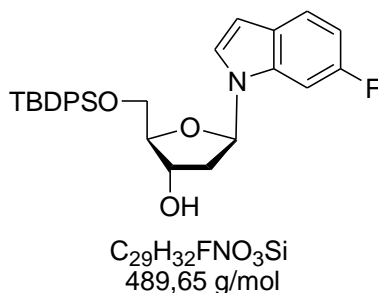
7,59 (d, 1H, $J_{2H,3H}=3,3$ Hz; 2H); 7,52 (dd, 1H, $J_{4H,5H}=8,7$ Hz, $J_{4H,6F}=5,6$ Hz; 4H); 7,47 (dd, 1H, $J_{7H,5H}=10,1$ Hz, 7H); 6,90 (ddd, 1H, $J_{4H,5H}=8,7$ Hz, $J_{5H,7H}=2,2$ Hz; $J_{5H,6F}=10,1$ Hz; 5H); 6,51 (d, 1H, $J_{2H,3H}=3,3$ Hz, 3H); 6,33 (pt, 1H, $J_{1'H,2'H\beta}=6,4$ Hz, $J_{1'H,2'H\alpha}=7,2$ Hz, 1'H); 5,26 (d, 1H, $J=4,2$ Hz; 3'OH); 4,89 (t, 1H, $J=5,3$ Hz; 5'OH); 4,35 (m, 1H, 3'H); 3,81 (m, 1H, 4'H); 3,53 (m, 2H, 5'H); 2,47 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,21 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$);

^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, DMSO- d_6)

-120,84 (m, 1F, 6F);

ESI(-): m/z 249,9 (M-H) $^{-}$

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)-6-fluorindol 102



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,40g (5,6 mmol) 1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-6-fluorindol wurden in 15 ml abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. 1,65 ml (6,4 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilyl-chlorid wurde innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt auf Kieselgel adsorbiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 4,30 g (85 %)

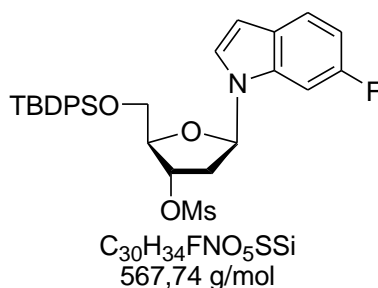
DC: R_f=0,20 (*n*-Hexan:EtOAc/4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

7,65-7,15 (m, 14H, Ar-H); 6,82 (ddd, 1H, J_{4H,5H}=8,7 Hz, J_{5H,7H}=2,2 Hz, J_{5H,6H}=10,1 Hz, 5H); 6,43 (d, 1H, J= 3,2 Hz, 3H); 6,20 (pt, 1H, J_{1'H,2'Hβ}=6,3 Hz, J_{1'H,2'Hα}=7,3 Hz 1'H); 5,25 (d, 1H, J=4,1 Hz, 3'OH); 4,65 (m, 1H, 3'H); 3,97 (m, 1H, 4'H); 3,78 (m, 2H, 5'H); 2,57 (m, 1H, 2'Hβ); 2,31 (m, 1H, 2'Hα); 1,02 (s, 9H, *t*-Bu);

ESI(+): m/z 490,2 (M+H)⁺

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl-β-D-erythro-pentofuranosyl)-6-fluorindol 103



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,50g (5,1 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl)-6-fluorindol wurden in 100 ml eines Gemisches aus abs. Methylenchlorid / Pyridin 4:1 gelöst. Die Reaktionslösung wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und mit 8 ml (102 mmol) MsCl versetzt. Die Reaktionsmischung wurde vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol gequencht und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das verbleibende Öl wurde mit Methylenchlorid versetzt und einmal mit Wasser extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,87g (99%)

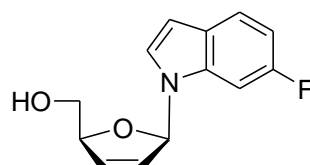
DC: Rf=0,30 (*n*-Hexan:EtOAc / 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6)
 7,69-7,20 (m, 14H, Ar-H); 6,93 (ddd, 1H, $J_{4\text{H},5\text{H}}=8,8$ Hz, $J_{7\text{H},5\text{H}}=2,3$ Hz, $J_{5\text{H},6\text{F}}=9,4$ Hz, 5H); 6,32 (pt, 1H, $J_{1'\text{H},2'\text{H}\beta}=5,5$ Hz, $J_{1'\text{H},2'\text{H}\alpha}=3,5$ Hz, 1'H); 5,53 (m, 1H, 3'H); 4,34 (m, 1H, 4'H); 3,93 (dd, 1H, $J_{5'\text{H}\alpha,5'\text{H}\beta}=11,4$ Hz, $J_{4'\text{H},5'\text{H}\alpha}=3,2$ Hz, 5'H $_{\alpha}$); 3,84 (dd, 1H, $J_{4'\text{H},5'\text{H}\beta}=4,2$ Hz; $J_{5'\text{H}\alpha,5'\text{H}\beta}=11,4$ Hz, 5'H $_{\beta}$); 3,10 (s, 3H, SCH $_3$); 2,76 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,47 m, 1H, 2'H $_{\alpha}$); 1,14 (s, 9H, *t*-Bu);

$^{13}\text{C NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO- d_6)
 161,18 (C $_{Ar}$); 158,81 (C $_4$); 136,42 (C $_{Ar}$); 135,58 (d, $J=10,6$ Hz, C $_6$); 132,48 (C $_{Ar}$); 129,97 (C $_8$); 127,92 (C $_{Ar}$); 125,44 (C $_3$); 124,38 (C $_{Ar}$); 121,69 (C $_9$); 109,25 (C $_7$); 96,75 (C $_2$); 96,45 (C $_5$); 84,87 (C $_1'$); 83,90 (C $_3'$); 80,27 (C $_4'$); 76,68 (C $_5'$); 63,38 (C $_2'$); 38,44 (SCH $_3$); 26,92 (SiC($\underline{\text{C}}\text{H}_3$) $_3$); 19,24 (Si $\underline{\text{C}}$ (CH $_3$) $_3$);

ESI(+): m/z 568,5 (M+H) $^+$

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-6-fluorindol 104



C $_{13}$ H $_{12}$ FO $_2$
 233,24 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2,70g (4,8 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-6-fluorindol wurden in 70 ml abs. THF gelöst und mit 17,6 (17,6 mmol) einer 1 M Tetra-Butylamoniumfluorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 50 C zwei Stunden lang unter Argon gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel: 1.

Chloroform:Methanol/98:2; 2. Chloroform:Methanol/95:5; 3. Chloroform:Methanol/98:2.
Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,07g (97 %)

DC: Rf=0,51 (CHCl₃: MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
7,55 (m, 2H, 2H,7H); 7,37 (d, 1H, J=3,4 Hz, 1'H); 7,03 (m, 1H, 4H);
6,91 (ddd, 1H, J_{4H,5H}=8,6 Hz, J_{5H,7H}=2,2 Hz, J_{5H,6H}=9,9 Hz, 5H); 6,49 (m, 2H, 3H,3'H); 6,13 (m, 1H, 2'H); 4,86 (t, 1H, J=5,6 Hz, 5'OH);
4,78 (m, 1H, 4'H); 3,52 (m, 2H, 5'H);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (250,1 MHz, DMSO-*d*₆)

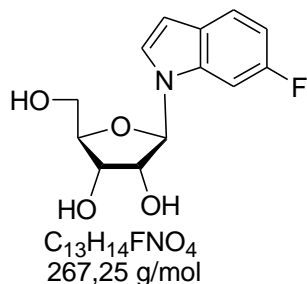
-120,88 (m, 1F, 6F);

ESI(+): m/z 233,9 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 66,94% H: 5,19% N: 6,01%

Gefunden: C: 66,85% H: 5,34% N: 6,12%

1'-Desoxy-1'-(6-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose 105



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,02g (4,4 mmol) 1-(2',3'-Dideoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-6-fluorindol wurde mit 1,62g (11,9 mmol) N-Methylmorpholin-4-oxid Monohydrat versetzt und in 50 ml eines Gemisches aus Wasser und Aceton im Verhältnis 8:1 gelöst. Die Lösung wurde mit 5,49 ml einer 2,5%–igen OsO₄-Lösung in *t*-Butanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml 10%-iger wässriger Na₂S₂O₄-Lösung gequencht und noch 15 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 100 ml

Wasser versetzt und dreimal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,79 g (68%)

DC: $R_f=0,21$ (CH_2Cl_2 : MeOH/ 95:5)

^1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

7,58 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 2H); 7,53 (dd, 1H, $J_{4\text{H},5\text{H}}=8,6$ Hz; $J_{4\text{H},6\text{H}}=5,6$ Hz; 4H); 7,46 (dd, 1H, $J_{7\text{H},5\text{H}}=2,1$ Hz; $J_{7\text{H},6\text{H}}=10,7$ Hz; 7H); 6,91 (ddd, 1H, $J_{4\text{H},5\text{H}}=8,6$ Hz, $J_{5\text{H},7\text{H}}=2,1$ Hz, $J_{5\text{H},6\text{H}}=9,7$ Hz, 5H); 6,51 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 3H); 5,81 (d, 1H, $J=6,1$ Hz; 1'H); 5,30 (d, 1H, $J=6,7$ Hz; 3'OH); 5,12 (d, 1H, $J=5,0$ Hz; 2'OH); 5,03 (t, 1H, $J=5,3$ Hz; 5'OH); 4,19 (m, 1H, 2'H); 4,08 (m, 1H, 3'H); 3,90 (m, 1H, 4'H); 3,61 (m, 2H, 5'H);

^{13}C NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

160,01 (C2); 135,70 (C4); 126, 58 (C7); 125,27 (C8); 121,38 (C6); 108,10 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1'); 84,88 (C4'); 73,90 (C2'); 70,21 (C3'); 61,42 (C5');

^{19}F -NMR: δ [ppm] (250,1 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

-120,95 (s, 1F, 6F);

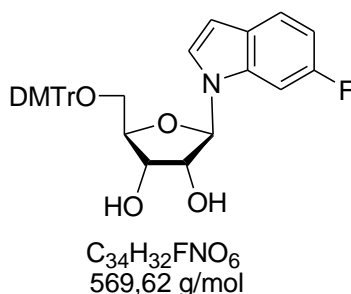
ESI(-): m/z 265,9 (M-H^-)

El.Analyse: Berechnet: C: 58,42 % H: 5,28 % N: 5,24 %

Gefunden: C: 58,33 % H: 5,30 % N: 5,17 %

Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{260}=6300 \text{ cm}^2\text{mol}^{-1}$

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(6-fluorindolyl) -β-D-ribofuranose 106



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,50 g (1,89 mmol) 1'-Desoxy-1'-(6-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose wurde in 15 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,35 ml (2,82 mmol) Triethylamin und 0,68 g (2,03 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3ml Methanol gequencht und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,62 g (58 %)

DC: R_f = 0,61 (CH₂Cl₂:MeOH/ 99:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

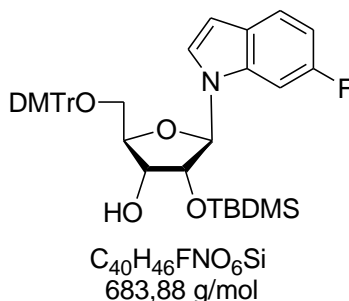
7,59-7,21 (m, 12H, H_{Ar}) 6,93 (ddd, 1H, J_{4H,5H}=8,4 Hz, J_{5H,7H}=2,0 Hz, J_{5H,6H}=9,3 Hz, 5H); 6,84 (m, 4H, H_{Ar}); 6,51 (d, 1H, J=3,2 Hz; 3H); 5,90 (d, 1H, J=5,2 Hz; 1'H); 5,49 (d, 1H, J=6,1 Hz; 3'OH); 5,18 (d, 1H, J=4,3 Hz; 2'OH); 4,31 (m, 1H, 2'H); 4,15 (m, 1H, 3'H); 4,06 (m, 1H, 4'H); 3,72 (s, 6H, OCH₃); 3,22 (m, 2H, 5'H);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, DMSO-*d*₆)

-122,39 (m, 1F, 6F);

ESI(+): m/z 570,4 (M+H)⁺

**5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-
1' - (6-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose 107**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,50 g (0,88 mmol) 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(6-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 180 mg (1,04 mmol) Silbernitrat und 1,24 ml (1,24 mmol) einer 1 M *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen $NaHCO_3$ -Lösung gequencht. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das Rohrprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel, *n*-Hexan:MeOAc/10:1,8). Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,18 g (30 %)

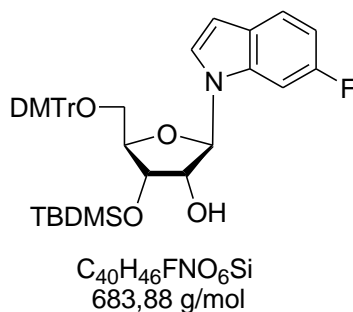
DC: $R_f=0,54$ (*n*-Hexan:EtOAc/4:1)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$)
 7,50-6,86 (m, 17H, H_{Ar}); 6,54 (d, 1H, $J=3,3$ Hz; 3H); 5,92 (d, 1H, $J=6,2$ Hz; 1'H); 5,06 (d, 1H, $J=5,6$ Hz; 3'OH); 4,43 (m, H, 2'H); 4,11 (m, 2H, 4'H, 3'H); 3,73 (s, 6H, OCH_3); 3,27 (m, 2H, 5'H); 0,72 (s, 9H, $Si(CH_3)_3$); -0,12 (s, 3H, $SiCH_3$); -0,26 (s, 3H, $SiCH_3$);

^{13}C NMR: δ [ppm] (100,61 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
 158,35 (d, $J=39,4$ Hz; C_6); 145,34 (DMTr); 145,14 (DMTr); 136,14 (DMTr); 135,80 (DMTr); 130,25 (C_{Ar}); 128,29 (DMTr); 127,21 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 125,80 (DMTr); 124,26 (DMTr); 122,00 (C_{Ar}); 116,61 (C_{Ar}); 113,16 (C_{Ar}); 108,80 (C_{Ar}); 103,00 (C_{Ar}); 99,88 (DMTr); 86,22 ($\text{C}1'$); 76,12 ($\text{C}4'$); 72,25 ($\text{C}2'$); 70,70 ($\text{C}3'$); 126,58 ($\text{C}7$); 125,27 ($\text{C}8$); 121,38 ($\text{C}6$); 108,10 ($\text{C}5$); 102,16 ($\text{C}9$); 97,13 ($\text{C}3$); 89,04 ($\text{C}1'$); 84,88 ($\text{C}4'$); 73,90 ($\text{C}2'$); 70,21 ($\text{C}3'$); 64,42 ($\text{C}5'$); 55,47 (OCH_3); 26,10 ($\text{SiC}(\underline{\text{CH}}_3)_3$), 18,34 ($\text{Si}\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$); -4,03 (SiCH_3); -5,06 (SiCH_3);

ESI(-): m/z 684,34 ($\text{M}+\text{H}^-$)

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (6-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose 108



5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (6-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt (*fast-Isomer*) bei der Synthese von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (6-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose.

Ausbeute: 0,17g (28%)

DC: Rf=0,49 (n-Hexan:EtOAc/4:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6)

7,52-7,22 (m, 16H, H_{Ar}); 6,84 (ddd, 1H, $J_{4H,5H}=8,4$ Hz, $J_{5H,7H}=2,1$ Hz, $J_{5H,6H}=9,3$ Hz, 5H); 6,53 (d, 1H, $J=3,3$ Hz; 3H); 5,88 (d, 1H, $J=5,1$ Hz; 1'H); 5,36 (d, 1H, $J=6,5$ Hz; 2'OH); 4,31 (m, 2H, 2'H, 3'H); 4,03 (m, 1H, 4'H); 3,74 (s, 6H, OCH_3); 3,13 (m, 2H, 5'H); 0,79 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,05 (s, 3H, SiCH_3); -0,12 (s, 3H, SiCH_3);

^{13}C NMR: δ [ppm] (100,9 MHz, DMSO- d_6)

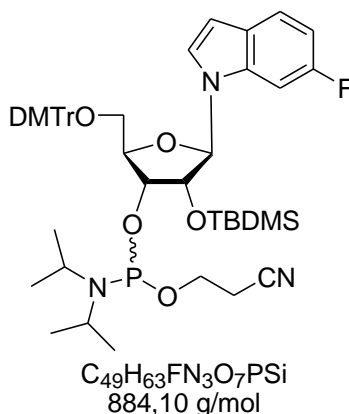
156,05 (d, $J=39,4$ Hz; C6); 145,39 (DMTr); 145,24 (DMTr); 136,00 (DMTr); 135,70 (DMTr); 130,30 (C_{Ar}); 128,29 (DMTr); 127,21 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 125,80 (DMTr); 124,26 (DMTr); 122,00 (C_{Ar}); 116,61 (C_{Ar}); 113,16 (C_{Ar}); 108,80 (C_{Ar}); 103,00 (C_{Ar}); 99,88 (DMTr); 86,22 (C1'); 76,32 (C4'); 73,25 (C2'); 71,70 (C3'); 126,70 (C7); 125,27 (C8); 121,38 (C6); 109,20 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1'); 84,88 (C4'); 73,90 (C2'); 70,21 (C3'); 64,42 (C5'); 55,47 (OCH_3); 26,10 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$), 18,34 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); -4,20 (SiCH_3); -4,86 (SiCH_3);

^{19}F -NMR: δ [ppm] (250,1 MHz, DMSO- d_6)

-120,79 (s, 1F, 6F)

ESI(-): m/z 684,70 ($\text{M}+\text{H}^-$)

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(6-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose 58



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 160 mg (0,18 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(6-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 250 μ l (1,8 mmol) *sym.* Collidin und 8 μ l (0,1 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 65 μ l (0,29 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit wurden zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:EtOAc/ 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 147 mg (71 %)

DC: R_f=0,36; 0,31(*n*-Hexan:EtOAc/ 4:1)

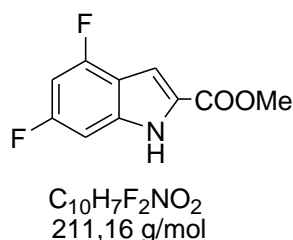
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

7,54-6,71 (m, 36H, H_{Ar}); 5,78 (d, $J=7,8$ Hz ; 2H, 1'H); 4,54 (m, 2H, 3'H); 4,15 (m, 2H, 2'H); 3,73; 3,71 (s, 12H, OCH_3); 3,49 (m, 6H, 5'H, CH_2CN); 3,19 (m, 2H, 3'H); 2,72 (m, 4H, OCH_2); 1,20 (m, 12H, $CH(CH_3)_2$); 0,73; 0,72 (m, 18H, $SiC(CH_3)_3$); -0,05; -0,08; -0,15; -0,32 (s, 12H, $SiCH_3$);

^{31}P -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$)
150,63 und 148,74 (Verhältnis 1: 3,6);

ESI(-): m/z 884,7 ($M+H$) $^+$

Methyl-4,6-difluorindol-carboxylat 26



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. Die Lösung aus 12,1 ml (65,3 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol und 30 ml abs. Methanol wurde auf $-20^\circ C$ abgekühlt. Eine Lösung aus 2,00 g (14,1 mmol) 2,4-Difluorbenzaldehyd und 7,5 g (65,3 mmol) Methylazidoacetat in 17 ml abs. Methanol wurde über 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde zwei Stunden bei $-20^\circ C$ und über Nacht bei $+4^\circ C$ gerührt. Anschließend wurde die heterogene Mischung auf Eis (ca. 300 ml) gegossen bis eine Temperatur von $5-10^\circ C$ erreicht wurde. Der weiße Feststoff wurde abgesaugt und Filterkuchen mit Wasser nachgespült. Das Produkt ist instabil und musste gleich verwendet werden. Das Rohprodukt Methyl-2-azido-*o-p*-difluorobenzoyl-propenoat wurde in 50 ml Xylen gelöst und zwei Mal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet. Der Ansatz wurde nun tropfenweise zu 200 ml refluxierendem Xylen gegeben. Die Reaktionsmischung wurde ca. 4 Stunden gekocht, bis kein N_2 mehr entwickelte. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer

zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 2,17 g (73%) über zwei Schritte

DC: $R_f=0,49$ (CH_2Cl_2);

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
12,36 (s, 1H, NH,); 7,16 (m, 1H, 7H); 7,04 (m, 1H, 3H); 6,92 (ddd, 1H, $J_{7\text{H},5\text{H}}=2,0$ Hz; $J_{4\text{F},5\text{H}}=8,3$ Hz; $J_{6\text{F},5\text{H}}=8,3$ Hz; 5H); 3,89 (s, 3H, OCH_3);

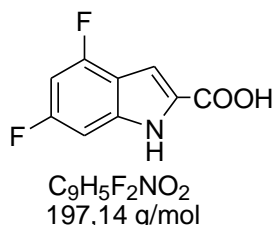
$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (235,4 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
-116,65 (m, 1F, 6F), -114,20 (m, 1F, 4F)

ESI(-): m/z 209,6 (M-H)⁻

El.Analyse: Berechnet: C: 56,88% H: 3,34% N: 6,63%

Gefunden: C: 57,04% H: 3,41% N: 6,48%

4,6-Difluorindol-2-carbonsäure 109



6,5 g (30,8 mmol) Methyl-4,6-difluorindol-2-carboxylat wurden in 450 ml 2 N NaOH-Lösung gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die Reaktionslösung wurde auf 0°C abgekühlt und neutralisiert mit einer äquivalenten Menge konzentrierter Salzsäure. Die Lösung darf sich dabei nicht erwärmen. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten, der abgesaugt und mit Eiswasser gewaschen wurde.

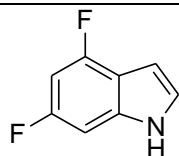
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
8,25 (bs, 1H, NH,); 7,10 (s, 1H, 3H); 7,02 (dd, 1H, $J_{7\text{H},6\text{F}}=9,4$ Hz; $J_{5\text{H},7\text{H}}=1,3$ Hz; 7H); 6,91 (ddd, 1H, $J_{5\text{H},4\text{F}}=10,4$ Hz; $J_{5\text{H},6\text{F}}=10,4$ Hz; $J_{5\text{H},7\text{H}}=2,0$ Hz; 5H); 3,42 (bs, 1H, COOH);

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (235,4 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

-116,91 (m, 1F, 6F), -114,82 (m, 1F, 4F);

MALDI: m/z 197,92 (M+H)⁺

4,6-Difluorindol 29



C₈H₅F₂N
153,13 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

5,00 g (25,4 mmol) der 4,6-Difluorindol-2-carbonsäure wurde in 300 ml N-Methylpyrrolidon gelöst und mit 6,46 g (101,6) mmol Kupferpulver versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über 12 Stunden bei 240°C gekocht. Ein Argonstrom wurde langsam und kontinuierlich durchgeleitet. Anschließend wurde die Reaktionsmischung abgekühlt und über Celite filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Ether gewaschen. Das Filtrat wurde mit 500 ml Wasser versetzt und die Lösung vier Mal mit Ether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden ein Mal mit Wasser und ein Mal mit Brine gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,94 g (50 %)

DC: R_f = 0,43 (*n*-Hexan:EtOAc/85:15)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

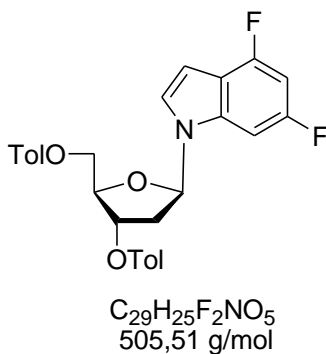
7,35 (d, 1H, J=2,6 Hz; 2H); 7,04 (dd, 1H, J_{5H,7H}=2,1 Hz; J_{7H,6F}=9,6 Hz; 7H); 6,77 (ddd, 1H, J_{7H,5H}=2,1 Hz; J_{4F,5H}=10,4 Hz; J_{6F,5H}=10,4 Hz; 5H); 6,45 (d, 1H, J=2,0 Hz; 3H); 3,46 (bs, 1H, NH)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-*d*₆)

159,60 (C4); 157,22 (C6); 137,85 (C5); 126,67 (C8); 122,98 (C3); 116,78 (C9); 109,91 (C7); 97,32 (C2)

ESI(-): m/z 152,24 (M-H)⁻

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]- 4,6-difluorindol 37



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,00 g (6,53 mmol) 4,6-Difluorindol wurden in 100 ml abs. Acetonitril gelöst, mit 235 mg (9,80 mmol) NaH versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Danach wurden 3,05 g (7,84 mmol) 3,5 Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D- α -ribofuranose zugegeben und noch 20 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 gequench bis die Reaktionslösung neutral war. Ionenaustauscher wurde durch Celite abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 85:15. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 3,27 g (99%)

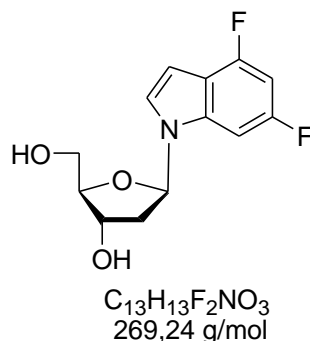
DC: Rf=0,33 (*n*-Hexan:EtOAc/85:15)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6)

8,00 (d, 2H, $J=8,2$ Hz; *o*-Tol-H); 7,86 (d, 2H, $J=8,2$ Hz; *o'*-Tol-H); 7,63 (d, 1H, $J=3,5$ Hz; 2H) 7,53 (dd, 1H, $J_{7H,6F}=9,6$ Hz; $J_{7H,5H}=1,7$ Hz; 7H) 7,50 (d, 2H, $J=1,6$ Hz; *m*-Tol-H); 7,37 (d, 2H, $J=8,2$ Hz; *m'*-Tol-H); (ddd, 1H, $J_{7H,5H}=1,7$ Hz; $J_{4F,5H}=9,4$ Hz; $J_{6F,5H}=9,4$ Hz; 5H); 6,59 (m, 2H, 1'H, 3H); 6,12 (m, 1H, 4'H); 4,55 (m, 2H, 3'H, 5'H); 2,94 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,70 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$); 2,41 (s, 3H, Ar-CH $_3$); 2,37 (s, 3H, Ar-CH $_3$);

^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,4 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 -119,00 (m, 1F, 6F); -118,01 (m, 1F, 4F);
 ESI(+): m/z 527,9 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol 38



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt 3,20g (6,3 mmol) 1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]- 4,6-difluorindol wurden in 220 ml abs. Methanol gelöst und mit 7,5 ml (40,5 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 (bis PH ca. 7) gequencht. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

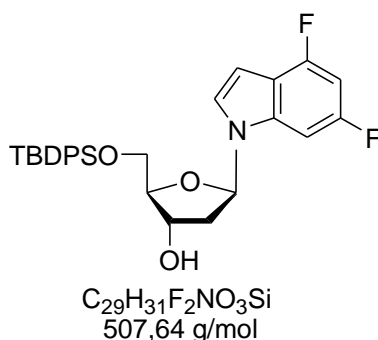
Ausbeute: 1,67g (98 %)

DC: $R_f=0,50$ (CH_2Cl_2 :MeOH/ 9:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 7,64 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 2H); 7,43 (dd, 1H, $J_{5\text{H},7\text{H}}=1,6$ Hz; $J_{7\text{H},6\text{F}}=10,2$ Hz; 7H); 6,88 (ddd, 1H, $J_{7\text{H},5\text{H}}=2,0$ Hz; $J_{4\text{F},5\text{H}}=10,3$ Hz; $J_{6\text{F},5\text{H}}=10,3$ Hz; 5H); 6,56 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 3H); 6,33 (pt, 1H, $J_{1'\text{H},2'\text{H}\beta}=6,1$ Hz; $J_{1'\text{H},2'\text{H}\alpha}=7,2$ Hz; 1'H); 5,28 (d, 1H, $J=4,2$ Hz; 3'OH); 4,93 (1H, $J=5,4$ Hz; 5'OH); 4,36 (m, 1H, 3'H); 3,83 (m, 1H, 4'H); 3,54 (m, 2H, 5'H); 2,47 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,29 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$);

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
158,9 (d, $J=49,6$ Hz; C4); 153,8 (d, $J=61,2$ Hz; C6); 137,5 (C8);
127,0 (C3); 114,4 (C9); 98,2 (C2); 95,4 (C5); 94,3 (C7); 87,6 (C1');
85,5 (C3'); 71,0 (C4'); 62,1 (C5'); 30,1 (C2');
ESI(-): m/z 267,9 (M-H)⁻
El.Analyse: Berechnet: C: 58,00% H: 4,87% N: 5,20%
Gefunden: C: 58,28% H: 5,03% N: 5,08%

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol 39



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,5g (5,6 mmol) 1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol wurden in 20 ml abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. 1,6 ml (6,2 mmol) *t*-Butyldiphenylsilyl-chlorid wurden innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionslösung wurde dann 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt auf Kieselgel adsorbiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

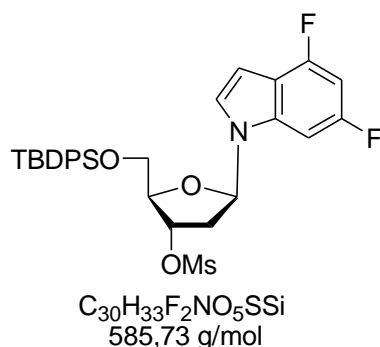
Ausbeute: 2,49 (88 %)
DC: $R_f=0,50$ (CH_2Cl_2 / 9:1)
 ^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

7,56-7,29 (m, 12H, H_{Ar}); 6,86 (ddd, 1H, $J_{7H,5H}=1,9$ Hz; $J_{4F,5H}=10,3$ Hz; $J_{6F,5H}=10,2$ Hz; 5H); 6,47 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 3H); 6,34 (pt, 1H, $J_{1'H,2'H\beta}=6,4$ Hz; $J_{1'H,2'H\alpha}=6,5$ Hz; 1'H); 5,35 (d, 1H, $J=4,6$ Hz; 3'OH); 4,43 (m, 1H, 3'H); 3,89 (m, 1H, 4'H); 3,72 (m, 2H, 5'H); 2,49 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,30 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$); 2,05 (s, 9H, *t*-Bu);

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO- d_6)
 155,7 (d, $J=50,6$ Hz; C4); 154,8 (d, $J=62,2$ Hz; C6); 141,5 (C8);
 137,5 (C $_{Ar}$); 135,8 (C $_{Ar}$); 135,6 (C $_{Ar}$); 135,2 (C $_{Ar}$); 133,0 (C $_{Ar}$);
 132,2 (C $_{Ar}$); 129,8 (C $_{Ar}$); 128,5 (C $_{Ar}$); 128,2 (C $_{Ar}$); 128,1 (C $_{Ar}$);
 127,9 (C $_{Ar}$); 127,5 (C $_{Ar}$); 126,9 (C2); 111,2 (C9); 103,1 (C3); 95,7
 (C5); 93,6 (C7); 83,5 (C1'); 83,3 (C4'); 65,3 (C3'); 64,2 (C5');
 36,0 (C2'); 25,73 (SiC(CH $_3$) $_3$); 20,5 (SiC(CH $_3$) $_3$); 19,5 (SiC(CH $_3$) $_3$);
 14,5 (SiC(CH $_3$) $_3$);

ESI(-): m/z 505,8 (M-H) $^-$

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol 40



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

2 g (3,94 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl- β - D- *erythro*-pentofuranosyl)- 4,6- difluorindol wurden in 75 ml eines Gemisches aus abs. Methylenchlorid / Pyridin 4:1 gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und mit 6,2 ml (78,8 mmol) MsCl versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml Methanol gequencht und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das verbleibende Öl wurde mit Methylenchlorid versetzt und ein

Mal mit Wasser extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,28 g (99 %)

DC: $R_f=0,16$ (*n*-Hexan:EtOAc/85:15)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

7,60-7,33 (m, 12H, H_{Ar}); 6,92 (m, 1H, 5H); 6,54 (d, 1H, $J=3,4\text{Hz}$; 3H); 6,45 (pt, 1H, $J_{1'H,2'H\beta}=6,3\text{Hz}$; $J_{1'H,2'H\alpha}=6,4\text{Hz}$; 1'H); 5,44 (m, 1H, 3'H); 4,26 (m, 1H, 4'H); 3,81 (m, 2H, 5'H); 3,30 (s, 9H, SCH_3) 2,85 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,73 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$); 0,99 (s, 9H, *t*-Bu)

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (235,3 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

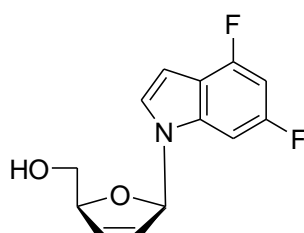
-119,02 (m, 1F, 6F); -117,84 (m, 1F, 4F)

ESI(+): m/z 586,1 ($\text{M}+\text{H}^+$)

El.Analyse: Berechnet: C: 61,52% H: 5,68% N: 2,39%

Gefunden: C: 61,35% H: 5,47% N: 2,43%

1-(2',3'-Didesoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-4,6-difluorindol 41



$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{F}_2\text{NO}_2$
251,23 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,5 g (2,6 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol wurden in 50 ml abs. THF gelöst und mit 9,5 (9,5 mmol) einer 1 M Tetra-Butylamoniumfluorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden unter Argon bei 50°C gerührt. Anschließend wurde die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte drei Mal durch FC mit dem Elutionsmittel:

1. Chloroform:Methanol/98:2; 2. Chloroform:Methanol/95:5; 3. Chloroform:Methanol/98:2. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,42 g (98,5 %)

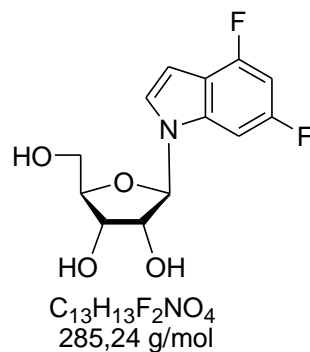
DC: R_f=0,52 (CH₃Cl:MeOH/95:%)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
 7,51 (dd, 1H, J=1,8 Hz; 7H); 7,43 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H); 7,03 (d, 1H, J= 1,3 Hz; 1'H); 6,89 (ddd, 1H, J_{7H,5H}= 1,8 Hz; J_{4F,5H}=10,3 Hz; J_{6F,5H}=10,2 Hz; 5H); 6,56 (d, 1H, J=3,4 Hz; 3H); 6,48 (m, 1H, 2'H); 6,13 (m, 1H, 2'H); 6,13 (m, 1H, 3'H); 4,87 (t, 1H, J=5,4 Hz; 5'OH); 4,81 (m, 1H, 4'H); 3,51 (m, 2H, 5'H);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (235,4 DMSO-*d*₆)
 -119, 17 (m, 1F, 6F); -118,37 (m, 1F, 4F);

ESI(+): m/z 251,9 (M+H)⁺

1'-Desoxy-1'-(4,6-difluorindolyl)-β-D-ribofuranose 42



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1 g (4,0 mmol) 1-(2',3'-Dideoxy-β-D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-4,6-difluorindol wurde mit 1,47 g (10,8 mmol) N-Methylmorpholin-4-oxid Monohydrat versetzt und in 50 ml eines Gemisches aus Aceton/Wasser im Verhältnis 8:1 gelöst. Die Lösung wurde mit 5,0 ml einer 2,5%-igen OsO₄-Lösung in *t*-Butanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 ml 10%-iger wässriger Na₂S₂O₄-Lösung gequencht und noch 15 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 100 ml

Wasser versetzt und drei Mal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,77 g (68 %)

DC: $R_f=0,16$ (*n*-Hexan:EtOAc/1:2)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

7,65 (d, 1H, $J=3,4\text{Hz}$; 2H); 7,41 (dd, 1H, $J_{5\text{H},7\text{H}}=1,7\text{Hz}$; $J_{7\text{H},6\text{F}}=10,1\text{Hz}$; 7H); 6,88 (ddd, 1H, $J_{7\text{H},5\text{H}}=2,0\text{Hz}$; $J_{4\text{F},5\text{H}}=10,3\text{Hz}$; $J_{6\text{F},5\text{H}}=10,3\text{Hz}$; 5H); 6,58 (d, 1H, $J=6,6\text{Hz}$; 3H); 5,82 (d, 1H, $J=6,2\text{Hz}$; 1' H); 5,34 (d, 1H, $J=6,7\text{Hz}$; 2' OH); 5,14 (d, 1H, $J=4,9\text{Hz}$; 3' OH) 5,06 (t, 1H, $J=5,3\text{Hz}$; 5' OH); 4,23 (m, 1H, 2' H); 4,07 (m, 1H, 3' H) 3,94 (m, 1H, 4' H); 3,62 (m, 2H, 5' H);

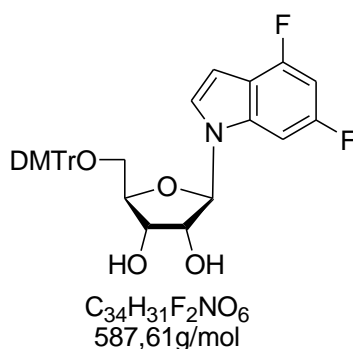
$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (235,2 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

-118,17 (m, 1F, 6F); -119,13 (m, 1F, 4F)

ESI(-):m/z 283,8 ($\text{M}+\text{H}^+$)

Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{260}=6530$

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(4,6-difluorindolyl) - β -D-ribofuranose 51



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,54 g (1,89 mmol) 1'-Desoxy-1'-(4,6-difluorindolyl)- β -D-ribofuranose wurden in 15 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,35 ml (2,82 mmol) Triethylamin und 0,68 g (2,03 mmol) 4,4'- Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde

24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3ml Methanol gequencht und mit gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung versetzt. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,79 g (71 %)

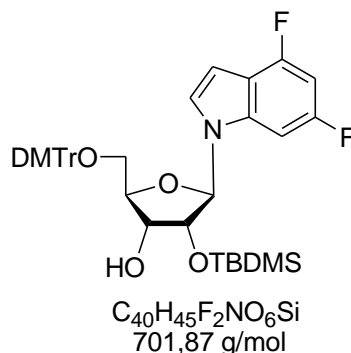
DC: $R_f=0,56$ (CH_2Cl_2 / 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
7,50 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 2H); 7,34-6,79 (m, 15H, H_{Ar}) 6,54 (d, 1H, $J=2,5$ Hz; 3H); 5,86 (d, 1H, $J=5,0$ Hz; 1'H); 5,49 (d, 1H, $J=6,1$ Hz; 2'OH); 5,16 (d, 1H, $J=5,7$ Hz, 3'OH); 4,28 (m, 1H, 2'H); 4,12 (m, 1H, 3'H); 4,04 (m, 1H, 4'H); 3,69 (s, 6H, OCH_3); 3,21 (m, 2H, 5'H);

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
158,5 (DMTr); 145,3 (DMTr); 137,7 (DMTr); 135,9 (C2); 130,2 (DMTr); 128,3 (C5); 128,2 (C7); 127,2 (C4); 126,8 (C3); 125,2 (DMTr); 123,4 (DMTr); 122,0 (DMTr); 121,0 (DMTr); 119,7 (DMTr); 118,6 (C8); 117,8 (DMTr); 115,4 (C6); 115,2 (DMTr); 114,8 (DMTr); 114,2 (DMTr); 113,6 (DMTr); 111,0 (DMTr); 109,8 (DMTr); 107,6 (C9); 89,2 (C1'); 87,3 (DMTr); 85,7 (DMTr); 83,5 (C4'); 73,2 (C2'); 70,1 (C3'); 64,0 (C5'); 55,1 (OCH_3);

MALDI: m/z 611,58 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (4,6-difluorindolyl) - β -D-ribofuranose 52



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,33 g (0,6 mmol) 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(4,6-difluorindolyl) - β -D-ribofuranose wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 122 mg (0,72 mmol) Silbernitrat und 0,84 ml (0,84 mmol) einer 1 M *tert*.-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen $NaHCO_3$ -Lösung gequencht. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel, *n*-Hexan:EtOAc/5:1). Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,16 g (40 %)

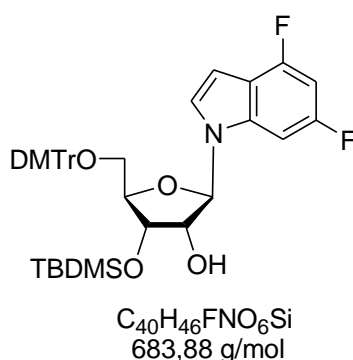
DC: $R_f=0,54$ (*n*-Hexan:Ethylacetat /4:1)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$)
 7,53 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 2H); 7,40-6,85 (m, 15H, H_{Ar}); 6,60 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 3H); 5,93 (d, 1H, $J=6,2$ Hz; 1'H); 5,09 (d, 1H, $J=5,6$ Hz; 3'OH); 4,44 (t, 1H, $J= 5,5$ Hz; 2'H); 4,10 (m, 1H, 3'H, 4'H); 3,73 (s, 6H, OCH_3); 3,27 (m, 2H, 5'H); 0,71 (s, 9H, *t*-Bu); -0,12 (s, 3H, $SiCH_3$); -0.27 (s, 3H, $SiCH_3$);

^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,2 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 -118,20 (m, 1F, 6F); -119,00 (m, 1F, 4F)

ESI(-):m/z 700,4 (M-H)⁻

**5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-
 1' - (4,6-difluorindolyl) - β -D-ribofuranose 53**



5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (4,6-difluorindolyl) - β -D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt (*fast-Isomer*) bei der Synthese von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (6-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose.

Ausbeute: 0,15 g (37,5 %)

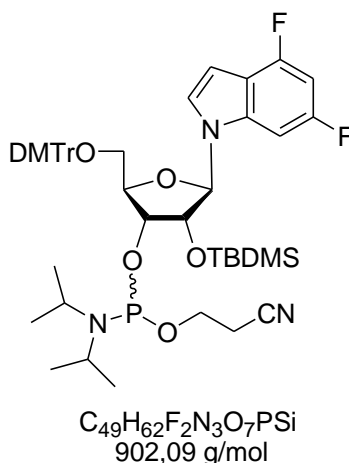
DC: R_f =0,50 (*n*-Hexan:Ethylacetat /4:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 7,58 (d, 1H, J =3,4 Hz; 2H); 7,40-6,59 (m, 15H, H_{Ar}); 5,83 (d, 1H, J =5,2 Hz; 1'H); 5,39 (d, 1H, J =6,5 Hz; 2'OH); 4,31 (m, 1H, 3'H); 4,27 (m, 1H, 2'H); 4,03 (m, 1H, 3'H, 4'H); 3,72 (s, 6H, OCH_3); 3,14 (m, 2H, 5'H); 0,80 (s, 9H, *t*-Bu); 0,04 (s, 3H, SiCH_3); -0,02 (s, 3H, SiCH_3);

^{19}F -NMR: δ [ppm] (235,2 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 -118,18 (m, 1F, 6F); -118,95 (m, 1F, 4F)

ESI(-):m/z 700,4 (M-H)⁻

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorindolyl)- β -D-ribofuranose 54



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 150 mg (0,21 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(4,6-difluorindolyl)- β -D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 280 μ l (2,14 mmol) *sym*. Collidin und 10 μ l (0,12 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 72 μ l (0,32 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit zugesetzt wurden. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:EtOAc/ 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 130 mg (68 %)

DC: R_f=0,44; 0,29 (*n*-Hexan:EtOAc/ 4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

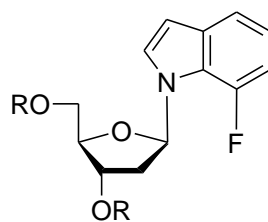
7,40-6,74 (m, 32H, H_{Ar}); 6,54; 6,50 (d, 2H, J=3,6 Hz; 3H); 5,82; 5,79 (d, J=7,8 Hz; 2H, 1'H); 4,58 (m, 2H, 2'H); 4,21 (m, 2H, 3'H); 3,98 (

m, 2H, 4'H); 3,90; 3,73 (s, 12H, OCH₃); 3,53 (m, 8H, 5'H, CH₂CN);
 2,60 (m, 4H, OCH₂); 1,12 (m, 12H, CH(CH₃)₂); 0,73; 0,64 (m, 18H,
 SiC(CH₃)₃); -0,15; -0,20; -0,44; -0,45 (s, 12H, SiCH₃);

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
 151,82 und 148,93 (Verhältnis 1: 5,6)

ESI(+): m/z 902,72 (M+H)⁺

**1-[2'-Desoxy-3',5'-bis-O-(4-methylbenzoyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]- 7-
 fluorindol 110**



R=p-Me-C₆H₄-CO

C₂₉H₂₆FN₂O₅
 487,52 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,0 g (7,4 mmol) 7-Fluorindol wurden in 100 ml abs. Acetonitril gelöst, mit 266 mg (11,1 mmol) NaH versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Danach wurden 3,45 g (8,9 mmol) 3,5 Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D-α-ribofuranose zugegeben und noch 20 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde gegencht durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 bis die Reaktionslösung neutral ist. Ionenaustauscher wurde durch Celite abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 85:15. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 3,58 (99 %)

DC: R_f=0,39 (Hexan:EtOAc/ 85:15)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
 7,96 (m, 2H, H_{Ar}); 7,86 (m, 2H, H_{Ar}); 7,69 (d, 1H, J=3,3Hz, 2H);
 7,43-7,30 (m, 5H, H_{Ar}); 7,04 (m, 2H, H_{Ar}); 6,70 (pt, 1H, J_{1'H2'Hβ}=6,6
 Hz; J_{1'H, 2'Hα}=7,6 Hz; 1'H); 6,63 (d, 1H, J=3,3 Hz; 3H); 5,69 (m, 1H,

3^{\prime}H); 4,57-4,46 (m, 3H, 5^{\prime}H , 4^{\prime}H); 2,96 (m, 1H, $2^{\prime}\text{H}_{\beta}$); 2,74 (m, 1H, $2^{\prime}\text{H}_{\alpha}$); 2,37 (s, 3H, Ar-CH₃); 2,35 (s, 3H, Ar-CH₃)

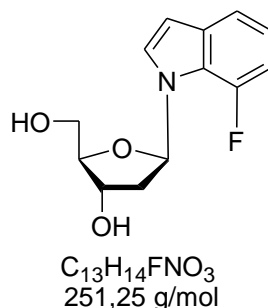
^{19}F -NMR: δ [ppm] (282,3 MHz, DMSO- d_6)
-132,04 (m, 1F, 7F)

ESI(+): m/z 505,1 (M+NH₄)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 71,46% H: 5,34% N: 2,87%

Gefunden: C: 71,35% H: 5,39% N: 2,68%

1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7-fluorindol 111



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt 3,55 g (7,3 mmol) 1-[2'-Desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]- 7-fluorindol wurden in 250 ml abs. Methanol gelöst und mit 8,6 ml (46,4 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol versetzt. Die Reaktionmischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 (bis PH ca. 7) gequencht. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1,35 g (74 %)

DC: R_f=0,63 (CH₂Cl₂ / 9:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (300 MHz, DMSO- d_6)
7,73 (d, 1H, J=3,2 Hz; 2H); 7,40 (m, 1H, H_{Ar}); 6,97 (m, 2H, H_{Ar});
6,51 (m, 2H, 3H, 1'H); 5,31 (d, 1H, J=4,2 Hz; 3'OH); 4,85 (t, 1H, J=

5,6 Hz; 5'OH); 4,31 (m, 1H, 3'H); 3,72 (m, 1H, 4'H); 3,53 (m, 2H, 5'H); 2,40 (m, 1H, 2'H_β); 2,37 (m, 1H, 2'H_α)

¹³C NMR: δ [ppm] (300 MHz, DMSO-*d*₆)

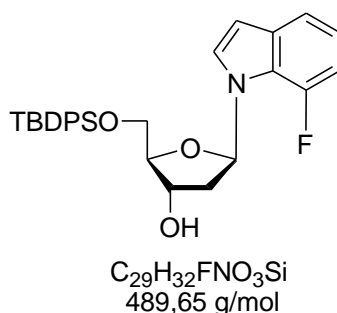
132,50 (d, J=45,0 Hz; C7); 132,40 (C2); 126,42 (C_{Ar}); 123,05 (C_{Ar}); 122,93 (C_{Ar}); 119,97 (C_{Ar}); 119,80 (C_{Ar}); 116,80 (C_{Ar}); 87,10 (C4'); 86,07 (C1'); 70,71 (C3'); 61,83 (C5'); 60,47 (C2');

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (282,3 MHz, DMSO-*d*₆)

-132,23 (m, 1F, 7F)

ESI(-): m/z 250,0 (M-H)⁻

1-(2'-Desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7-fluorindol 112



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,99 g (3,94 mmol) 1-(2'-Desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-7-fluorindol wurden in 20 ml abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. 1,15 ml (4,48 mmol) *t*-Buthyldiphenylsilyl-chlorid wurden innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionslösung wurde dann 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt auf Kieselgel adsorbiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1,72 g (89,1 %)

DC: R_f=0,36 (*n*-Hexan:EtOAc/4:1)

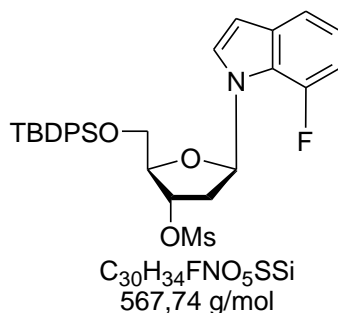
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
 7,66 (m, 5H, H_{Ar}); 7,48-7,38 (m, 7H, H_{Ar}); 7,10-7,01 (m, 2H, H_{Ar});
 6,60 (pt, 1H, $J_{1'\text{H}2'\text{H}\beta}=6,3$ Hz; $J_{1'\text{H}2'\text{H}\alpha}=7,1$ Hz; $1'\text{H}$); 6,55 (d, 1H, $J=$
 3,1 Hz; 2H); 5,47 (d, 1H, $J=4,3$ Hz; $3'\text{OH}$); 4,50 (m, 1H, $3'\text{H}$); 3,97 (m, 1H, $4'\text{H}$); 3,77 (m, 2H, $5'\text{H}$); 2,48 (m, 1H, $2'\text{H}_\beta$); 2,39 (m, 1H, $2'\text{H}_\alpha$); 1,04 (s, 9H, $t\text{-Bu}$);

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (282,3 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
 -132,64 (m, 1F, 7F)

ESI(+): m/z 490,2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

El.Analyse: Berechnet: C: 71,13% H: 6,59% N: 2,86%
 Gefunden: C: 70,84% H: 6,83% N: 2,67%

1-(2'-Desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7-fluorindol 113



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,69 g (3,45 mmol) 1-(2'-Desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7-fluorindol wurden in 80 ml eines Gemisches aus abs. Methylenchlorid / Pyridin 4:1 gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und mit 5,4 ml (69 mmol) MsCl versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol gequencht und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das verbleibende Öl wurde mit Methylenchlorid versetzt und einmal mit Wasser extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO_4

getrocknet und eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 1,82 g (93 %)

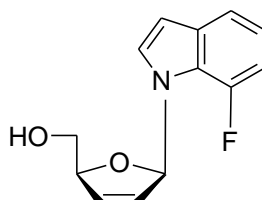
DC: R_f=0,36 (*n*-Hexan:EtOAc / 4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
 7,64-7,59 (m, 5H, H_{Ar}); 7,49-7,31 (m, 7H, H_{Ar}); 7,10-6,98 (m, 2H, H_{Ar}); 6,61 (pt, 1H, J_{1'H,2'Hβ}=7,1 Hz; J_{1'H,2'Hα}=6,6 Hz; 1'H); 6,53 (m, 1H, H_{Ar}); 5,46 (m, 1H, 3'H); 4,27 (m, 1H, 4'H); 3,74 (m, 2H, 5'H); 3,30 (s, 3H, SCH₃); 2,93 (m, 1H, 2'Hβ); 2,81 (m, 1H, 2'Hα); 1,00 (s, 9H, *t*-Bu);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (282,3 MHz, DMSO-*d*₆)
 -132,56 (m, 1F, 7F)

ESI(+): m/z 567,9 (M+H)⁺

1-(2',3'-Didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-7-fluorindol 114



C₁₃H₁₂FNO₂
 233,24 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,78 g (3,1 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-7-fluorindol wurden in 60 ml abs. THF gelöst und mit 11,5 ml (11,5 mmol) einer 1 M *tetra*-Butylamoniumfluorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden unter Argon bei 50°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte dreimal durch FC mit dem Elutionsmittel: 1.Chloroform:Methanol/98:2; 2. Chloroform:Methanol/95:5; 3. Chloroform:Methanol/98:2. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,61 g (83,6 %)

DC: R_f=0,59 (CHCl₃: MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

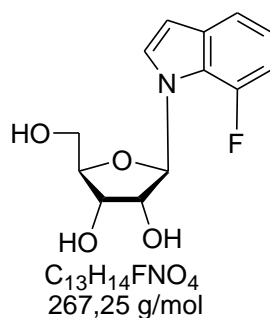
7,43 (d, 1H, J=3,3 Hz; 2H); 7,38 (m, 1H, 1'H); 7,14 (m, 1H, 4H);
7,01 (m, 2H, 5H, 6H); 6,57 (m, 1H, 3H); 6,48 (m, 1H, 3'H); 6,18 (m,
1H, 2'H); 4,83 (m, 2H, 4'H, 5'OH); 3,46 (m, 2H, 5'H);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (282,3 MHz, DMSO-*d*₆)

-132,40 (m, 1F, 7F);

ESI(+): m/z 233,9 (M+H)⁺

1'-Desoxy-1'-(7-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose 115



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,48 g (2,1 mmol) 1-(2',3'-Didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-7-fluorindol wurde mit 0,77 g (5,7 mmol) N-Methylmorpholin-4-oxid Monohydrat versetzt und in 27 ml eines Gemisches aus Aceton/Wasser 8:1 gelöst. Die Lösung wurde mit 2,62 ml einer 2,5%-ige OsO₄-Lösung in *t*-Butanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml 10%-iger wässriger Na₂S₂O₄-Lösung gequencht und noch 15 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 100 ml Wasser versetzt und zweimal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,35 g (63%)

DC: R_f=0,14 (*n*-Hexan:EtOAc / 4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

7,80 (d, 1H, J=3,5 Hz; 2H); 7,44 (d, 1H, J=7,6 Hz; 4H); 7,05 (m, 2H, 5H, 6H); 6,68 (d, 1H, J=3,5 Hz; 3H); 6,16 (d, 1H, J=5,8 Hz; 1'H); 5,39 (d, 1H, J=6,6 Hz; 3'OH); 5,18 (d, 1H, J=4,8 Hz; 2'OH); 5,03 (t, 1H, J=5,3 Hz; 5'OH); 4,33 (m, 1H, 4'H); 4,12 (m, 1H, 2'H); 3,95 (m, 1H, 3'H); 3,61 (m, 2H, 5'H);

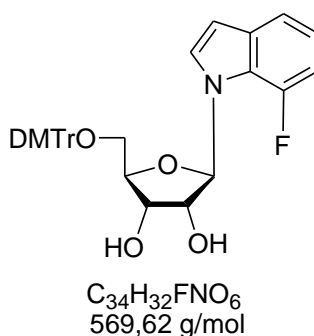
¹⁹F-NMR: δ [ppm] (283,3 MHz, DMSO-*d*₆)

-132,13 (m, 1F, 7F);

ESI(-): m/z 266,0 (M-H)⁻

Extinktionskoeffizient: ε₂₆₀=6510 cm²mol⁻¹

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(7-fluorinolyl) -β-D-ribofuranose 116



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,20 g (0,75 mmol) 1'-Desoxy-1'-(7-fluorindolyl)-β-D-ribofuranose wurde in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,15 ml (1,1 mmol) Triethylamin und 0,30 g (0,89 mmol) 4,4'- Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3ml Methanol gequencht und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer

zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,31 g (73 %)

DC: R_f = 0,49 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

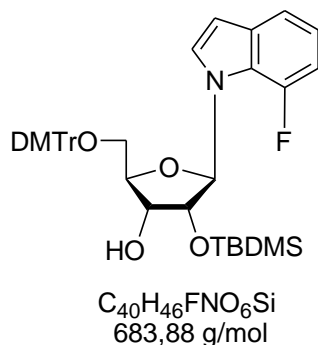
7,60 (d, 1H, J=3,1 Hz; 2H); 7,39 (m, 3H, H_{Ar}); 7,25 (m, 7H, H_{Ar});
7,03 (m, 2H, H_{Ar}); 6,83 (m, 4H, H_{Ar}); 6,59 (d, 1H, J=3,1 Hz; 3H);
6,15 (d, 1H, J=4,8 Hz; 1'H); 5,50 (d, 1H, J=5,8 Hz; 2'OH); 5,20 (d,
1H, J=5,8 Hz; 3'OH); 4,34 (m, 1H, 2'H); 4,14 (m, 1H, 3'H); 4,03 (m,
1H, 4'H); 3,73 (s, 6H, OCH₃); 3,17 (m, 2H, 5'H);

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (283,3 MHz, DMSO-*d*₆)

-132,20 (m, 1F, 7F);

ESI(-):m/z 568,4 (M-H)⁻

**5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-
1' - (7-fluorindolyl) -β-D-ribofuranose 117**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,30 g (0,53 mmol) 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(7-fluorinoly) -β-D-ribofuranose wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 108 mg (0,64 mmol) Silbernitrat und 0,64 ml (0,64 mmol) einer 1 M *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht.

Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol ko-evaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (*MN Nucleoprep 100-20* von *Macherey-Nagel*, (*n*-Hexan: EtOAc: CH_2Cl_2 /74:4:22). Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,13 g (36 %)

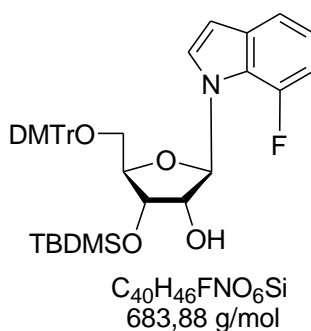
DC: $R_f=0,54$ (*n*-Hexan:Ethylacetat /4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 7,69 (d, 1H, $J=3,3$ Hz; 2H); 7,51-6,94 (m, 16H, H_{Ar}); 6,68 (d, 1H, $J=3,3$ Hz; 3H); 6,26 (d, 1H, $J=6,3$ Hz; 1'H); 5,16 (d, 1H, $J=5,2$ Hz; 3'OH); 4,46 (m, 1H, 2'H); 4,15 (m, 2H, 4'H, 3'H); 3,82 (s, 6H, OCH_3); 3,36 (m, 2H, 5'H); 0,83 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$); 0,03 (s, 3H, SiCH_3); - 0,20 (s, 3H, SiCH_3);

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (283,4 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 -131,96 (m, 1F, 7F);

ESI(+): m/z 706,4 ($\text{M}+\text{Na}$)+

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (7-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose 118



5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (4-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt (*fast-Isomer*) bei der

Synthese von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(6-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose.

Ausbeute: 0,12g (33 %)

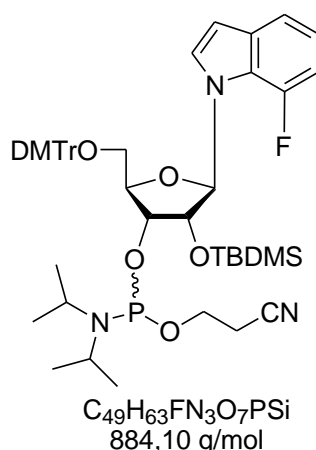
DC: Rf= 0,51 (*n*-Hexan:Ethylacetat /4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6)
 7,58 (d, 1H, $J=3,2$ Hz; 2H); 7,36-6,77 (m, 16H, H_{Ar}); 6,57 (d, 1H, $J=3,2$ Hz; 3H); 6,10 (d, 1H, $J=5,4$ Hz; 1'H); 5,30 (d, 1H, $J=6,3$ Hz; 2'OH); 4,30 (m, H, 2'H); 4,21 (m, 1H,, 3'H); 3,95 (m, 1H, 4'H); 3,69 (s, 6H, OCH_3); 3,15 (m, 2H, 5'H); 0,73 (s, 9H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,01 (s, 3H, SiCH_3); -0,07 (s, 3H, SiCH_3);

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (282,3 MHz, DMSO- d_6)
 -131,86 (m, 1F, 7F);

ESI(+): m/z 706,5 ($\text{M}+\text{Na}^+$)

3'- O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(7-fluorindolyl) - β -D-ribofuranose 59



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

110 mg (0,16 mmol) 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(7-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 350 μ l (2,6 mmol) *sym.* Collidin und 12 μ l (0,16 mmol) 1-

Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 53 µl (0,24 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:EtOAc/ 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 100 mg (70,4 %)

DC: R_f=0,35/0,39 (*n*-Hexan:EtOAc/ 4:1)

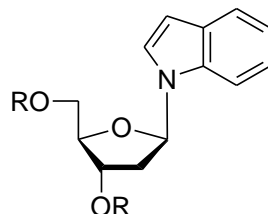
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7,72-6,56 (m, 36H, H_{Ar}); 5,88 (d, J=7,8 Hz ; 2H, 1'H); 4,60 (m, 2H, 3'H); 4,22 (m, 2H, 2'H); 3,85; 3,83 (s, 12H, OCH₃); 3,75 (m, 6H, 5'H, CH₂CN); 3,43 (m, 2H, 3'H); 2,82 (m, 4H, OCH₂); 1,38 (m, 12H, CH(CH₃)₂); 0,88; 0,75 (m, 18H, SiC(CH₃)₃); 0,24; 0,06; -0,20; -0,28 (s, 12H, SiCH₃);

³¹P-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
151,06 und 148,60 (Verhältnis 1: 3,2);

ESI(+): m/z 884,4 (M+H)⁺

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]-indol

119



R=p-Me-C₆H₄-CO

C₂₉H₂₇NO₅
469,53 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,40 g (12 mmol) Indol wurden in 100 ml abs. Acetonitril gelöst, mit 432 mg (18 mmol) NaH versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Danach wurden 5,59 g (14,4 mmol) 3,5 Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D-α-ribofuranose zugegeben und noch 20 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 gequenchet bis die Reaktionslösung neutral war. Ionenaustauscher wurde durch Celite abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 85:15. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 5,3 (95 %)

DC: R_f=0,30 (Hexan:EtOAc/ 85:15)

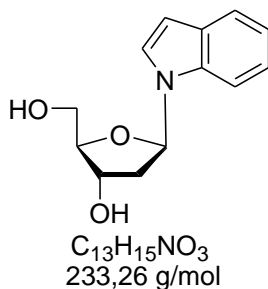
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

8,01 (m, 2H, H_{Ar}); 7,92 (m, 2H, H_{Ar}); 7,69 (d, 1H, J=3,4 Hz; 2H);
7,40 -7,33 (m, 6H, H_{Ar}); 7,07(m, 2H, H_{Ar}); ; 6,62 (m, 1H, H_{Ar}); 6,53 (pt, 1H, J_{1'H2'Hβ}=5,6 Hz; J_{1'H, 2'Hα}=6,7 Hz; 1'H); 5,72 (m, 1H, 3'H); 4,61 (m, 2H, 5'H); 4,52 (m, 1H, 4'H); 2,94 (m, 1H, 2'Hβ); 2,70 (m, 1H, 2'Hα); 2,47 (s, 3H, Ar-CH₃); 2,44 (s, 3H, Ar-CH₃);

ESI(+): m/z 569,5 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 71,18% H: 5,80% N: 2,98%

Gefunden: C: 74,38% H: 5,99% N: 2,95%

1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-indol 120

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

5,20 g (11,1 mmol) 1-[2'-desoxy-3',5'-bis-O-(4-methylbenzoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]-indol wurden in 300 ml abs. Methanol gelöst und mit 13,13 ml (70,8 mmol) einer 5,4 M MeONa-Lösung in Methanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 (bis pH ca. 7) gequencht. Der Ionenaustauscher wurde abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Hexan:Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 2,50 g (97 %)

DC: $R_f=0,58$ (CH_2Cl_2 / 9:1)

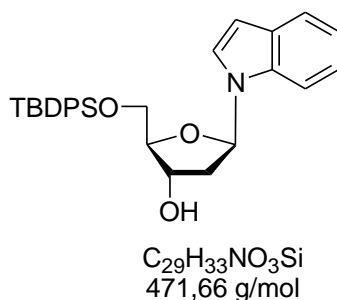
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

7,78 (m, 3H, H_{Ar}); 7,21 (m, 1H, H_{Ar}); 7,17 (m, 1H, H_{Ar}); 6,55 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 2H); 6,42 (pt, 1H, $J_{1'H,2'H\beta}=6,1$ Hz; $J_{1'H,2'H\alpha}=7,7$ Hz; 1'H); 5,34 (d, 1H, $J=4,2$ Hz; 3'OH); 4,93 (t, 1H, $J=5,4$ Hz; 5'OH); 4,40 (m, 1H, 3'H); 3,87 (m, 1H, 4'H); 3,61 (m, 2H, 5'H); 2,47 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,24 (m, 1H, 2H $_{\alpha}$);

$^{13}\text{C NMR}$: δ [ppm] (100,6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

138,3 (C_{Ar}); 128,6 (C_{Ar}); 126,9 (C2); 121,7 (C_{Ar}); 120,5 (C_{Ar}); 119,6 (C_{Ar}); 111,0 (C_{Ar}); 103,1 (C_{Ar}); 83,5 (C1'); 82,3 (C4'); 65,3 (C3'); 61,6 (C5'); 36,1 (C2');

ESI(-): m/z 231,8 (M-H^+)

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-indol 121

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,48 g (6,34 mmol) 1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-indol wurden in 25 ml abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. 1,9 ml (7,3 mmol) *t*-Butyldiphenylsilyl-chlorid wurde innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionslösung wurde dann 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt auf Kieselgel adsorbiert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 2,57 g (86 %)

DC: $R_f=0,60$ (CH_2Cl_2)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$)

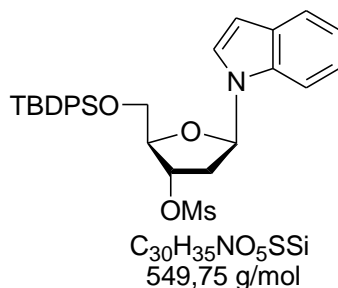
7,48-7,33 (m, 12H, H_{Ar}); 7,08 (m, 3H, H_{Ar}); 6,45 (m, 1H, H_{Ar}); 6,40 (pt, 1H, $J_{1'H,2'H\beta}=6,6$ Hz; $J_{1'H,2'H\alpha}=7,9$ Hz; $1'H$); 5,38 (d, 1H, $J=4,2$ Hz; $3'OH$); 4,48 (m, 1H, $3'H$); 3,92 (m, 1H, $4'H$); 3,74 (m, 2H, $5'H$); 2,53 (m, 1H, $2'H\beta$); 2,32 (m, 1H, $2'H\alpha$); 1,00 (s, 9H, *t*-Bu);

ESI(-): m/z 486,2 ($M-H$)⁻

El.Analyse: Berechnet: C: 73,85% H: 7,05% N: 2,97%

Gefunden: C: 73,76% H: 7,07% N: 3,06%

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-indol 122



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 2,32 g (4,9 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-indol wurden in 100 ml eines Gemisches aus abs. Methylenchlorid / Pyridin 4:1 gelöst. Die Reaktionslösung wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und mit 7,7 ml (98 mmol) MsCl versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml Methanol gequencht und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Das verbleibende Öl wurde mit Methylenchlorid versetzt und ein Mal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,5 g (93%)

DC: R_f=0,26 (*n*-Hexan:EtOAc / 4:1)

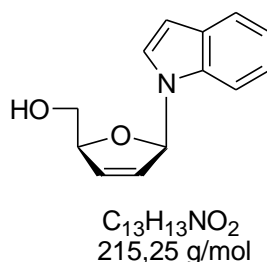
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

7,74-7,02 (m, 15H, H_{Ar}); 6,52 (m, 1H, H_{Ar}); 6,30 (m, 1H, 1'H); 5,45 (m, 1H, 3'H); 4,25 (m, 1H, 4'H); 3,92 (m, 2H, 5'H); 3,05 (s, 3H, SCH₃); 2,70 (m, 2H, 2'H); 1,07 (s, 9H, *t*-Bu);

ESI(+): m/z 549,9 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 65,54% H: 6,42% N: 2,55%

Gefunden: C: 65,35% H: 6,46% N: 2,38%

1-(2',3'-Dideoxy- β -D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-indol 123

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,75 g (2,1 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-indol wurden in 40 ml abs. THF gelöst und mit 7,8 ml (7,8 mmol) einer 1 M *tetra*-Butylamoniumfluorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden unter Argon bei 50°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte drei Mal durch FC mit dem Elutionsmittel: 1.Chloroform:Methanol/98:2;2.Chloroform:Methanol/95:5;3.Chloroform:Methanol/98:2 . Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,44 g (96 %)

DC: R_f=0,54 (CHCl₃: MeOH/ 95:5)

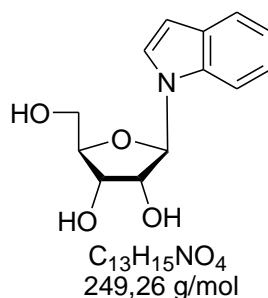
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

7,69 (d, 1H, J=3,0 Hz; 2H); 7,57 (d, 1H, J=4,6 Hz; 1'H); 7,35 (d, 1H, J=3,3 Hz; 7H); 7,18 (m, 1H, H_{Ar}); 7,15 (m, 1H, H_{Ar}); 7,10 (m, 1H, H_{Ar}); 7,06 (m, 1H, H_{Ar}); 6,47 (m, 1H, 3'H); 6,15 (m, 1H, 2'H); 4,79 (t, 1H, J=5,7 Hz; 5'OH); 4,78 (m, 1H, 4'H); 3,48 (m, 2H, 5'H);

ESI(+): m/z 215,6 (M+H)⁺

¹³C NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-*d*₆)

138,3 (C₈); 128,7 (C_{3'}); 128,6 (C₉); 127,2 (C_{2'}); 126,9 (C₂); 121,7 (C_{Ar}); 120,5 (C_{Ar}); 119,7 (C_{Ar}); 111,0 (C_{Ar}); 103,1 (C_{Ar}); 92,9,5 (C_{1'}); 80,3 (C_{4'}); 67,6 (C_{5'});

1'-Desoxy-1'-(indolyl)- β -D-ribofuranose 124

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,39g (1,8 mmol) 1-(2',3'-Didesoxy- β -D-*glycero*-pent-2-enofuranosyl)-indol wurden mit 0,66g (4,9 mmol) N-Methylmorpholin-4-oxid Monohydrat versetzt und in 20 ml eines Gemisches aus Aceton/Wasser im Verhältnis 8:1 gelöst. Die Lösung wurde mit 1,7 ml einer 2,5%-igen OsO_4 -Lösung in *t*-Butanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml 10%-iger wässriger $Na_2S_2O_4$ -Lösung gequencht und nochmals 15 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 100 ml Wasser versetzt und zwei Mal mit 200 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 1:2. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,18 g (40%)

DC: $R_f=0,16$ (CH_2Cl_2 : MeOH/ 95:5)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$)

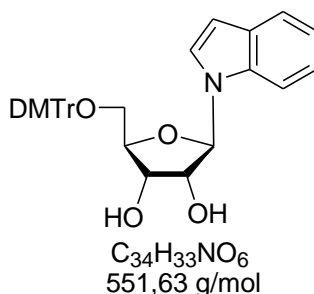
7,58 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; 2H); 7,17 (m, 1H, H_{Ar}); 7,14 (m, 1H, H_{Ar}); 7,10 (m, 1H, H_{Ar}); 7,05 (m, 1H, H_{Ar}); 6,48 (m, 1H, H_{Ar}); 6,03 (d, 1H, $J=6,1$ Hz; 1'H); 5,34 (d, 1H, $J=5,4$ Hz; 2'OH); 5,14 (s, 1H, 3'OH); 5,02 (t, 1H, $J=5,6$ Hz; 5'OH); 4,16 (d, 1H, $J=5,0$ Hz; 2'H); 4,08 (m, 1H, 3'H); 3,91 (m, 1H, 4'H); 3,66 (m, 2H, 5'H);

^{13}C NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, $DMSO-d_6$)

138,2 (C₈); 128,9 (C_{Ar}); 128,4 (C_{Ar}); 121,7 (C_{Ar}); 120,5 (C_{Ar});
 119,6 (C_{Ar}); 111,0 (C_{Ar}); 103,1 (C_{Ar}); 88,6 (C1'); 76,0 (C2'); 75,7 (C4');
 70,6 (C3'); 61,6 (C5');

ESI(-): m/z 265,7 (M-H)⁻

**5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(indolyl) -β-D-
 ribofuranose 125**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,29 g (1,2 mmol) 1'-Desoxy-1'-(indolyl)-β-D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,26 ml (1,9 mmol) Triethylamin und 0,49 g (1,44 mmol) 4,4'- Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3ml Methanol gequencht und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung versetzt. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde zwei Mal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,45 g (71 %)

DC: R_f= 0,50 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

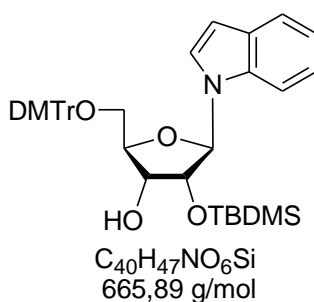
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

7,62 (m, 16H, H_{Ar}); 7,54 (d, 1H, J=3,3 Hz; 2H); 7,45-6,88 (m, 15H, H_{Ar}); 6,54 (d, 1H, J=3,3 Hz; 3H); 5,98 (d, 1H, J=5,1 Hz; 1'H); 5,51 (d, 1H, J=6,1 Hz; 2'OH); 5,23 (d, 1H, J=5,6 Hz; 3'OH); 4,40 (m, 1H, 2'H

); 4,22 (m, 1H, 3'H); 4,10 (m, 1H, 4'H); 3,78 (s, 6H, OCH₃); 3,26 (m, 2H, 5'H);

ESI(+): m/z 551,9 (M+H)⁺

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(indolyl) -β-D-ribofuranose 126



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,28 g (0,51 mmol) 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(indolyl) -β-D-ribofuranose wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 113 mg (0,67 mmol) Silbernitrat und 1,86 ml (1,86 mmol) einer 1 M *tert*.-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zwei Mal mit Toluol ko-evaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel, *n*-Hexan:EtOAc/6:1). Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,12 g (36 %)

DC: R_f=0,54 (*n*-Hexan:Ethylacetat /4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

7,70 (m, 2H, H_{Ar}); 7,63 (d, 1H, J=3,2 Hz; 2H); 7,55 (m, 2H, H_{Ar});

7,41 (m, 7H, H_{Ar}); 7,16 (m, 2H, H_{Ar}); 7,00 (m, 4H, H_{Ar}); 6,64 (d, 1H,

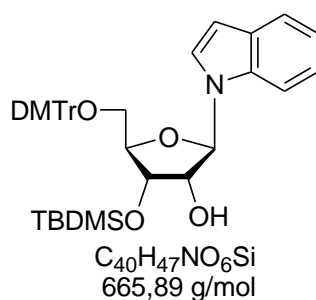
$J=3,2$ Hz; 3H); 6,08 (d, 1H, $J=6,1$ Hz; 1'H); 5,19 (d, 1H, $J=5,6$ Hz; 3'OH); 4,62 (m, H, 2'H); 4,26 (m, 1H, 3'H); 4,22 (m, 1H, 4'H); 3,87 (s, 6H, OCH₃); 3,41 (m, 2H, 5'H); 0,85 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0,01 (s, 3H, SiCH₃); -0,14 (s, 3H, SiCH₃);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,61 MHz, DMSO-*d*₆)

158,10 (C_{Ar}); 144,34 (DMTr); 142,17 (DMTr); 136,14 (DMTr); 135,80 (DMTr); 130,25 (C_{Ar}); 128,29 (DMTr); 127,21 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 125,80 (DMTr); 124,26 (DMTr); 122,00 (C_{Ar}); 116,61 (C_{Ar}); 113,16 (C_{Ar}); 108,80 (C_{Ar}); 103,00 (C_{Ar}); 99,88 (DMTr); 86,22 (C1'); 76,12 (C4'); 72,25 (C2'); 70,70 (C3'); 126,58 (C7); 125,27 (C8); 121,38 (C6); 108,10 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1'); 84,88 (C4'); 73,90 (C2'); 70,21 (C3'); 64,42 (C5'); 55,47 (OCH₃); 26,10 (SiC(CH₃)₃), 18,34 (Si(CH₃)₃); -4,03 (SiCH₃); -5,06 (SiCH₃);

ESI(+): m/z 665,8 (M+H)⁺

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (indolyl) - β -D-ribofuranose 127



5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (indolyl) - β -D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt (fast-*Isomer*) bei der Synthese von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (6-fluorinolyl) - β -D-ribofuranose.

Ausbeute: 0,11g (32 %)

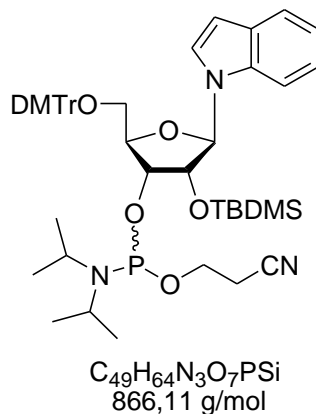
DC: R_f = 0,51 (*n*-Hexan:Ethylacetat /4:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
7,50 (m, 3H, H_{Ar}); 7,33 (m, 2H, H_{Ar}); 7,22 (m, 7H, H_{Ar}); 7,04 (m, 2H, H_{Ar}); 6,78 (m, 4H, H_{Ar}); 6,45 (d, 1H, J=3,3 Hz; 3H); 5,85 (d, 1H, J=5,6 Hz; 1'H); 5,27 (d, 1H, J=5,2 Hz; 2'OH); 4,31 (m, H, 2'H); 4,22 (m, 1H, 3'H); 3,92 (m, 1H, 4'H); 3,06 (s, 6H, OCH₃); 3,06 (m, 2H, 5'H); 0,77 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0,11 (s, 3H, SiCH₃); -0,07 (s, 3H, SiCH₃);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,9 MHz, DMSO-*d*₆)
158,10 (d, J=39,4 Hz; C₄); 144,62 (DMTr); 144,84 (DMTr); 138,91 (DMTr); 135,29 (DMTr); 130,05 (C_{Ar}); 128,79 (DMTr); 127,20 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 126,17 (DMTr); 122,26 (DMTr); 122,02 (C_{Ar}); 118,01 (C_{Ar}); 117,20 (C_{Ar}); 115,80 (C_{Ar}); 113,90 (C_{Ar}); 99,88 (DMTr); 86,22 (C1'); 76,12 (C4'); 72,25 (C2'); 70,70 (C3'); 126,58 (C7); 125,27 (C8); 121,38 (C6); 108,10 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1'); 84,88 (C4'); 73,28 (C2'); 71,85 (C3'); 63,04 (C5'); 55,07 (OCH₃); 25,73 (SiC(CH₃)₃), 17,34 (SiC(CH₃)₃); -4,03 (SiCH₃); -5,01 (SiCH₃);

ESI(+): m/z 666,2 (M+H)⁺

**3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-
Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(indolyl)
-β-D-ribofuranose 55**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

100 mg (0,15 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert.*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(indolyl)-β-D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 210 µl (1,6 mmol) *sym.* Collidin und 7 µl (0,09 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 54 µl (0,24 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan:EtOAc/ 4:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 100 mg (77 %)

DC: R_f=0,37; 0,32 (*n*-Hexan:EtOAc/ 4:1)

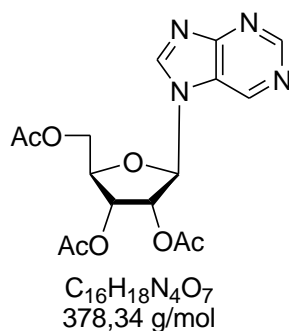
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)

7,41-6,53 (m, 36H, H_{Ar}); 5,91 (d, $J=7,8$ Hz ; 2H, 1' H); 4,62 (m, 2H, 3' H); 4,20 (m, 2H, 2' H); 3,73; 3,71 (s, 12H, OCH_3); 3,51 (m, 6H, 5' H, CH_2CN); 3,23 (m, 2H, 3' H); 2,62 (m, 4H, OCH_2); 1,18 (m, 12H, $CH(CH_3)_2$); 0,78; 0,75 (m, 18H, $SiC(CH_3)_3$); -0,22; -0,24; -0,46; -0,48 (s, 12H, $SiCH_3$);

^{31}P -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$)
151,38 und 148,77 (Verhältnis 1: 4,6);

ESI(+): m/z 867,2 ($M+H$) $^+$

2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose 46



Konventionell

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,50 g (12,48 mmol) Purin wurden in 60 ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 4,59 ml (18,72 mmol) *N*, *O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 15 Minuten unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3,96 g (12,48 mmol) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose in 20 ml abs. Acetonitril und 2,85 (15,60 mmol) Trimethylsilyltrifluorsulfonat (TMSOTf) zugesetzt. Es wurde 2,5 Stunden unter Rückfluss gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml ges. wässriger $NaHCO_3$ -Lösung gequencht und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,55 g (11,6 %)

Mikrowellen unterstützt

0,95 g (7,9 mmol) Purin wurden in 40 ml abs. Acetonitril suspendiert und mit 2,91 ml (11,85 mmol) *N*, *O*-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid und 2,51 g (7,9 mmol) 1,2,3,5-Tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 80°C und 150 W in der Mikrowellenkammer 15 Minuten bestrahlt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 1,81 ml (9,88 mmol) Trimethylsilyltrifluorsulfonat (TMSOTf) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 80°C und 150 W in der Mikrowellenkammer 60 Minuten bestrahlt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml ges. wässriger NaHCO₃-Lösung gequencht und dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

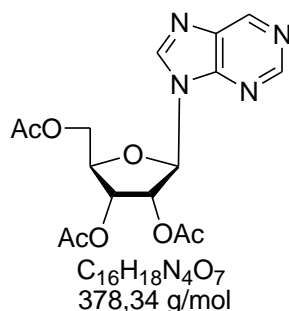
Ausbeute: 0,51 g (17,1 %)

DC: R_f=0,37 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-*d*₆)
9,31 (s, 1H, 6H); 9,05 (s, 1H, 2H); 8,95 (s, 1H, 8H); 6,43 (d, 1H, J=6,0 Hz; 1'H); 5,67 (m, 1H, 2'H); 5,44 (m, 1H, 3'H); 4,41 (m, 3H, 4'H, 5'H); 2,13 (s, 3 H, CH₃-acetyl); 2,08 (s, 3 H, CH₃-acetyl); 2,04 (s, 3 H, CH₃-acetyl);

¹³C NMR: δ [ppm] (68,9 MHz, DMSO-*d*₆)
170,43 (C=O); 169,92 (C=O); 169,73 (C=O); 160,92 (C4); 153,44 (C6); 148,35 (C2); 142,26 (C8); 124,26 (C5); 87,71 (C1'); 80,41 (C2'); 72,76 (C3'); 69,99 (C4'); 63,38 (C5'); 20,95 (CH₃-acetyl); 20,84 (CH₃-acetyl); 20,65 (CH₃-acetyl);

ESI(+): m/z 379,34 (M+H)⁺

2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(9-N-purin)-β-D-ribofuranose 47

2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(9-N-purin)-β-D-ribofuranose entstand als zweites Isomer bei der Darstellung von 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-N-purin)-β-D-ribofuranose.

Konventionell

Ausbeute: 2,9 g (66 %)

Mikrowellen unterstützt

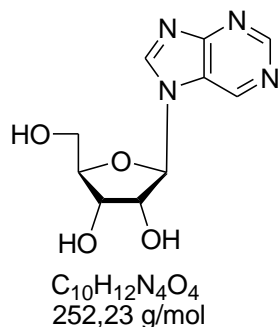
Ausbeute: 2,8 g (64 %)

DC: R_f=0,42 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-*d*₆)
 9,26 (s, 1H, 6H); 9,02 (s, 1H, 2H); 8,83 (s, 1H, 8H); 6,37 (d, 1H, J=5,3 Hz; 1'H); 6,09 (m, 1H, 2'H); 5,67 (dd, 1H, J=4,9 Hz; 3'H); 4,42 (m, 2H, 4'H, 5'H); 4,26 (m, 1H, 5'H,); 2,14 (s, 3 H, CH₃-acetyl); 2,06 (s, 3 H, CH₃-acetyl); 2,01 (s, 3 H, CH₃-acetyl);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, DMSO-*d*₆)
 170,49 (C=O); 169,91 (C=O); 169,74 (C=O); 160,00 (C4); 152,81 (C2); 149,01 (C6); 146,47 (C8); 134,76 (C5); 86,28 (C1'); 80,05 (C2'); 72,36 (C3'); 70,45 (C4'); 63,18 (C5'); 20,92 (CH₃-acetyl); 20,83 (CH₃-acetyl); 20,66 (CH₃-acetyl);

ESI(+): m/z 379,34 (M+H)⁺

1'-Desoxy-1'-(7-N-purin)-β-D-ribofuranose 48

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,51 g (4 mmol) 2',3',5'-Tri-O-acetyl-1'-desoxy-1'-(7-N-purin)-β-D-ribofuranose wurden in 60 ml einer Lösung aus 0,48 ml (2,6) 5,4 M NaOMe/MeOH und 59,50 abs. MeOH gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Dowex-80 gequencht. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid:Methanol/9:1. Das Produkt wurde als weißen Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,98 g (97 %)

DC: $R_f=0,32$ (CH_2Cl_2 :MeOH/ 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

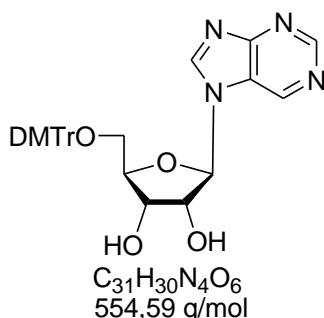
9,41 (s, 1H, 6H); 9,02 (s, 1H, 2H); 8,93 (s, 1H, 8H); 5,98 (d, 1H, $J=6,8$ Hz; 1'H); 5,55 (d, 1H, $J=6,6$ Hz 2'OH); 5,29 (d, 1H, $J=4,3$ Hz; 3'OH) 5,26 (t, 1H, $J=4,9$ Hz 5'OH); 4,38 (m, 1H, 2'H); 4,22 (m, 1H, 3'H); 4,04 (m, 1H, 4'H) 3,86 (m, 2H, 5'H);

$^{13}\text{C NMR}$: δ [ppm] (100,62 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

160,68 (C_{Ar}); 152,58 (C2); 147,98 (C8); 142,28 (C6); 123,91 (C_{Ar}); 89,70 (C1'); 86,27 (C4'); 74,11 (C2'); 70,18 (C3'); 61,11 (C5');

ESI(+): m/z 252,94 ($\text{M}+\text{H}^+$)

1'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(7-N-purin)-β-D-ribofuranose 60



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,50 g (2 mmol) 1'-Desoxy-1'-(7-N-purin)-β-D-ribofuranose wurden in 25 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,42 ml (3,0 mmol) Triethylamin und 0,81 g (2,4 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequenchet und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das Rohrprodukt wurde zweimal mit Toluol coevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 95:5. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,64 g (58 %)

DC: R_f=0,48 (CH₂Cl₂:MeOH/ 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-*d*₆)

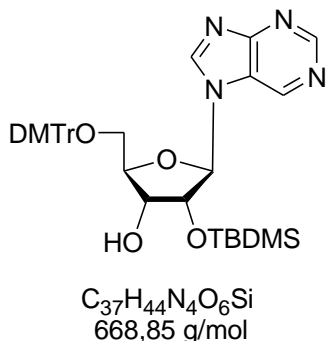
9,22 (s, 1H, 6H); 8,90 (s, 1H, 2H); 8,76 (s, 1H, 8H); 7,35-6,79 (m, 13H, H_{Ar}) 6,08 (d, 1H, J=7,4 Hz; 1'H); 5,65 (d, 1H, J=6,2 Hz; 2'OH); 5,31 (d, 1H, J=6,2 Hz; 3'OH); 4,79 (m, 1H, 2'H); 4,35 (m, 1H, 3'H); 4,13 (m, 1H, 4'H); 3,72 (s, 6H, OCH₃); 3,24 (m, 2H, 5'H);

ESI(+): m/z 555,4 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 67,14% H: 5,45% N: 10,10%

Gefunden: C: 67,35% H: 5,39% N: 10,28%

**5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-
1' - (7-*N*-purinoly) - β -D-ribofuranose 61**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,40 g (0,72 mmol) 1'-Desoxy-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-1'-(7-*N*-purin)- β -D-ribofuranose wurden in 20 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 150 mg (0,89 mmol) Silbernitrat und 1,02 ml (1,02 mmol) einer 1 M *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen $NaHCO_3$ -Lösung gequencht. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol ko-evaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (MN Nucleoprep 100-20 von Macherey-Nagel, *n*-Hexan:MeOAc/1:5). Das Produkt (*slow-Isomer*) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,17 g (36 %)

DC: $R_f=0,64$ (CH_2Cl_2 :MeOH/ 9:1)

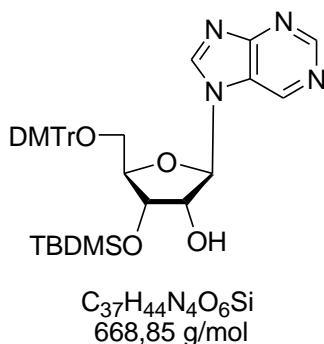
1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $DMSO-d_6$)

9,25 (s, 1H, 6H); 8,95 (s, 1H, 2H); 8,84 (s, 1H, 8H); 7,41-6,84 (m, 13H, H_{Ar}) 6,07 (d, 1H, $J=7,3$ Hz; 1'H); 5,31 (d, 1H, $J=6,1$ Hz; 3'OH); 4,68 (m, 1H, 2'H); 4,25 (m, 1H, 3'H); 4,13 (m, 1H, 4'H); 3,73 (s, 6H, OCH_3); 3,22 (m, 2H, 5'H); 0,73 (s, 9H, $SiC(CH_3)_3$); 0,13 (s, 3H, $SiCH_3$); -0,30 (s, 3H, $SiCH_3$);

^{13}C NMR: δ [ppm] (100,9 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 156,05 (C2); 145,39 (DMTr); 145,24 (DMTr); 136,00 (DMTr);
 135,70 (DMTr); 130,30 (C_{Ar}); 128,29 (DMTr); 127,21 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 125,80 (DMTr); 124,26 (DMTr); 122,00 (C_{Ar}); 116,61 (C_{Ar});
 113,16 (C_{Ar}); 108,80 (C_{Ar}); 103,00 (C_{Ar}); 99,88 (DMTr); 86,22 (C1');
 76,32 (C4'); 73,25 (C2'); 71,70 (C3'); 126,70 (C7); 125,27 (C8);
 121,38 (C6); 109,20 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1');
 84,88 (C4'); 73,90 (C2'); 70,21 (C3'); 64,42 (C5'); 55,47 (OCH_3);
 26,10 ($\text{SiC}(\underline{\text{CH}_3})_3$); 18,34 ($\text{SiC}(\underline{\text{CH}_3})_3$); -4,20 (SiCH_3); -4,86 (SiCH_3);

ESI(+): m/z 691,4 ($\text{M}+\text{Na}$)+

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (7-*N*-purinoly) - β -D-ribofuranose 62



5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (7-*N*-Purin) - β -D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt (*fast-Isomer*) bei der Synthese von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (7-*N*-Purin) - β -D-ribofuranose.

Ausbeute: 0,16g (33 %)

DC: $R_f=0,64$ (CH_2Cl_2 :MeOH/ 9:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 9,48 (s, 1H, 6H); 9,15 (s, 1H, 2H); 9,14 (s, 1H, 8H); 7,51-6,93 (m, 13H, H_{Ar}) 6,01 (d, 1H, $J=7,3$ Hz; 1'H); 5,22 (d, 1H, $J=6,1$ Hz; 2'OH);
 4,73 (m, 1H, 2'H); 4,33 (m, 1H, 3'H); 4,24 (m, 1H, 4'H); 3,68 (s, 6H,

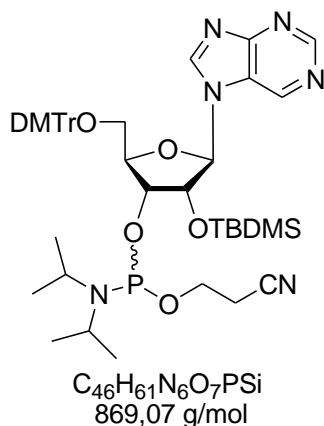
OCH₃); 3,21 (m, 2H, 5'H); 0,72 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); 0,12 (s, 3H, SiCH₃); -0,32 (s, 3H, SiCH₃);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,9 MHz, DMSO-*d*₆)

156,15 (C2); 145,90 (DMTr); 145,43 (DMTr); 136,13 (DMTr); 135,68 (DMTr); 130,25 (C_{Ar}); 128,27 (DMTr); 127,19 (C_{Ar}); 126,59 (DMTr); 125,77 (DMTr); 124,19 (DMTr); 122,05 (C_{Ar}); 116,64 (C_{Ar}); 113,09 (C_{Ar}); 108,77 (C_{Ar}); 103,05 (C_{Ar}); 99,87 (DMTr); 86,32 (C1'); 76,34 (C4'); 73,26 (C2'); 71,72 (C3'); 126,75 (C7); 125,32 (C8); 121,43 (C6); 109,19 (C5); 102,18 (C9); 97,17 (C3); 89,07 (C1'); 84,91 (C4'); 73,87 (C2'); 70,20 (C3'); 64,40 (C5'); 55,45 (OCH₃); 26,07 (SiC(CH₃)₃), 18,44 (SiC(CH₃)₃); -4,19 (SiCH₃); -4,87 (SiCH₃);

ESI(+): m/z 691,4 (M+Na)+

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(7-*N*-purinoly)-β-D-ribofuranose 63



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

100 mg (0,15 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(7-*N*-purinoly)-β-D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 200 µl (1,5 mmol) *sym*. Collidin und 6 µl (0,07 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 51 µl (0,23 mmol) 2-Cyanoethyl-diisopropylchlorphosphoramidit wurden

zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequenchet. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid:Methanol/99:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 80 mg (62 %)

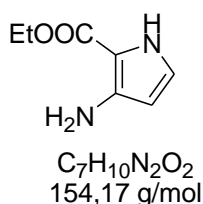
DC: R_f=0,45; 0,36 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)
7,40-6,74 (m, 32H, H_{Ar}); 6,54; 6,50 (d, 2H, J=3,6 Hz; 3H); 5,82; 5,79 (d, J=7,8 Hz ; 2H, 1'H); 4,58 (m, 2H, 2'H); 4,21 (m, 2H, 3'H); 3,98 (m, 2H, 4'H); 3,90; 3,73 (s, 12H, OCH₃); 3,53 (m, 8H, 5'H, CH₂CN); 2,60 (m, 4H, OCH₂); 1,12 (m, 12H, CH(CH₃)₂); 0,73; 0,64 (m, 18H, SiC(CH₃)₃); -0,15; -0,20; -0,44; -0,45 (s, 12H, SiCH₃);

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl₃)
152,41 und 148,96 (Verhältnis 1: 3,6)

ESI(+): m/z 870,72 (M+H)⁺

3-Amino-2-ethoxycarbonylpyrrol 30



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

Eine Lösung aus 20g (290 mmol) Isoxazol in Ethanol (80ml) wurde in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. Dazu wurden langsam 152ml (2M, 305 mmol) NaOEt/ EtOH-Lösung zugetropft. Das Reaktionsgemisch durfte sich dabei nicht über 8°C erwärmen. Nun wurde 30 Minuten gerührt und mit 5,5 ml (100mmol) Essigsäure neutralisiert. Die Reaktionsmischung wurde mit 40,9g (193 mmol) Diethyl-

aminomalonat Hydrochlorid und 16,4g (106 mmol) Natriumacetat versetzt und weitere 48 Stunden gerührt. Nach beendeter Umsetzung wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer abgezogen, das Rohrprodukt mit Chloroform/Wasser extrahiert, über MgSO_4 getrocknet und über Kieselgel abgesaugt. Die vereinigte organische Phase wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

Das orange Öl wurde in 400ml (0,5M) NaOEt/EtOH-Lösung gelöst und für 3 Tage bei RT weitergerührt. Das Reaktionsgemisch wurde durch die Zugabe von 12ml (210 mmol) Essigsäure neutralisiert und bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde in Chloroform gelöst und mit ges. wässriger NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, über Kieselgel abgesaugt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 15,8 g (35,4 %)

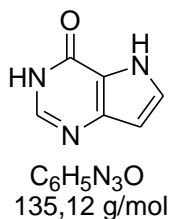
DC: $R_f=0,97$ (CH_2Cl_2 / 95:5)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
10,55 (s, 1H, NH); 6,82 (d, 1H, $J=3,6$ Hz; 5H); 5,56 (d, 1H, $J=3,6$ Hz; 4H); 4,97 (s, 2H, NH_2); 4,18 (q, 2H, $J=7,1$ Hz; CH_2); 1,21 (t, 3H, $J=7,0$ Hz; CH_3);

$^{13}\text{C NMR}$: δ [ppm] (100,62 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)
159,7 (C5); 123,2 (C3); 121,6 (C2); 114,7 (C4); 106,1 (C=O); 60,6 (CH_2); 14,6 (CH_3);

ESI(+): m/z 154,7 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

3*H*,5*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on 31



Das Rohprodukt wurde in 150 ml Ethanol gelöst und mit 16,6 g (158 mmol) zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 16 Stunden unter Rückfluss gekocht. Das Produkt entstand als gelber Feststoff.

Ausbeute: 5,96 g (43 %)

DC: Rf=0,58 (CH₂Cl₂ / 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-*d*₆)
12,18 (s, 1H, 9NH); 11,82 (s, 1H, 3NH); 7,80 (s, 1H, 2H); 7,38 (m, 1H, 8H); 6,35 (d, 1H, J=3,3 Hz; 7H);

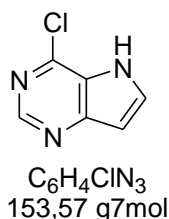
¹³C NMR: δ [ppm] (100,62 MHz, DMSO-*d*₆)
154,02 (C=O); 145,06 (C2); 141,81 (C5); 127,73 (C6); 118,20 (C8); 103,33 (C7);

ESI(+): m/z 135,7 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 53,33% H: 3,73% N: 31,10%

Gefunden: C: 53,41% H: 3,43% N: 31,21%

6-Chloro-9-deaza-purin 32



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,5 g (3,7 mmol) 3*H*, 5*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on wurden mit 40 ml Phosphoroxichlorid versetzt. Die Suspension wurde unter Rückfluss erhitzt, bis das Edukt gelöst ist und dann wird weitere 3 Stunden gekocht. . Die Reaktionsmischung wurde abgekühlt und auf Eis (ca. 200ml) gegossen. Nach der Neutralisierung mit NaOH (bis ca. pH 6) wurde die Lösung mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1 Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 1,44 g (85 %)

DC: R_f=0,50 (CH₂Cl₂ / 9:1)

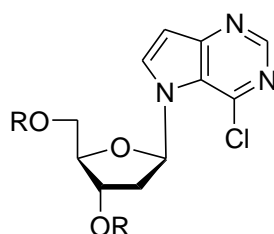
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)
12,46 (s, 1H, NH); 8,65 (s, 1H, 2H); 8,00 (d, 1H, J=3,3 Hz; 8H); 6,75 (d, 1H, J=3,3 Hz; 9H);

ESI(+): m/z 153,6 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 46,93% H: 2,63% N: 27,36%

Gefunden: C: 47,10% H: 2,79% N: 27,47%

1-[2'-desoxy-3',5'-bis- O-(4-methylbenzoyl)-β-D-erythro-pentofuranosyl]- 6-chloro-9-deaza-purin 133



R=p-Me-C₆H₄-CO

C₂₇H₂₄ClN₃O₅
505,95 g/mol

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 1,14 g (7,4 mmol) 6-Chloro-9-deaza-purin wurden in 130 ml abs. Acetonitril gelöst, mit 267 mg (11,1 mmol) NaH versetzt und bei Raumtemperatur 10 Minuten gerührt. Danach wurden 3,45 g (8,9 mmol) 3,5 Di-O-*p*-toluoyl-2-desoxy-D-α-ribofuranose zugegeben und noch 20 Minuten gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ionenaustauscher Dowex-80 gequench bis die Reaktionslösung neutral war. Ionenaustauscher wurde durch Celite abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 3,20 (85,3 %)

DC: R_f=0,37 (CH₂Cl₂:MeOH/ 98:2)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, CDCl₃)

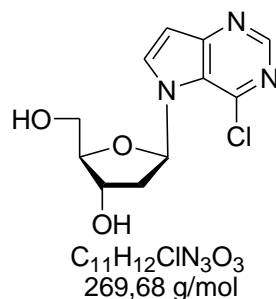
8,66 (s, 1H, 2H); 7,87 (m, 5H, H_{Ar}); 7,20 -7,07 (m, 5H, H_{Ar}); 6,65 (m, 1H, 1'H); 5,60 (m, 1H, 3'H); 4,63 (m, 2H, 5'H); 4,55 (m, 1H, 4'H); 2,76 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,53 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$); 2,37 (s, 3H, Ar-CH $_3$); 2,33 (s, 3H, Ar-CH $_3$);

MALDI: m/z 472,96 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 64,10% H: 4,78% N: 8,31%

Gefunden: C: 64,26% H: 4,93% N: 8,15%

1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-6-chloro-9-deaza-purin 128



5,80 g (11,5 mmol) 1-[2'-desoxy-3',5'-bis-O-(4-methylbenzoyl)- β -D-erythro-pentofuranosyl]- 6-chloro-9-deaza-purin wurden mit 100 ml ges. NH $_3$ /Methanol Lösung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als als weißer Feststoff gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1,88 g (61 %)

DC: R_f=0,35 (CH $_2$ Cl $_2$ / 9:1)

1 H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO- d_6)

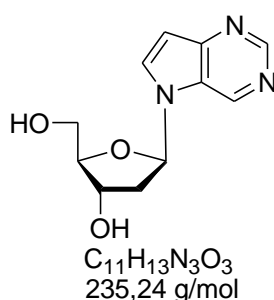
8,67 (s, 1H, 2H); 8,38 (d, 1H, J=3,4 Hz; 8H); 6,92 (pt, 1H, J_{1'H,2'H β} =6,3 Hz; J_{1'H,2'H α} =7,5 Hz; 1'H); 6,82 (d, 1H, J=3,4 Hz; 9H); 5,35 (d, 1H, J=4,0 Hz; 3'OH); 5,03 (t, 1H, J= 5,1 Hz; 5'OH); 4,36 (m, 1H, 3'H); 3,86 (m, 1H, 4'H); 3,57 (m, 2H, 5'H); 2,44 (m, 1H, 2'H $_{\beta}$); 2,37 (m, 1H, 2'H $_{\alpha}$);

13 C NMR: δ [ppm] (100,62 MHz, DMSO- d_6)

152,22 (C6); 149,42 (C2); 140,91 (C5); 134,41 (C8); 122,83 (C4);
 102,90 (C9); 87,62 (C1'); 70,08 (C3'); 61,21 (C4'); 41,20 (C2');
 39,68 (C5');

ESI(+): m/z 270,8 (M+H)⁺

1-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-9-deaza-purin 129



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter H₂ durchgeführt. 1,3 g (4,8 mmol) 1-(2'-desoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-6-chloro-9-deaza-purin wurden in 50 ml abs. Ethanol gelöst und mit 10%-ige Pd/H₂ versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung durch Celite abgesaugt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als weißer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,86 g (76 %)

DC: R_f=0,24 (CH₂Cl₂ / 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

9,27 (s, 1H, 2H); 8,87 (s, 1H, 6H); 8,10 (d, 1H, J=3,3 Hz; 8H); 6,72 (d, 1H, J=3,3 Hz; 9H); 6,47 (pt, 1H, J_{1'H,2'Hβ}=6,1 Hz; J_{1'H,2'Hα}=7,5 Hz; 1'H); 5,15 (d, 1H, J=4,0 Hz; 3'OH); 4,53 (t, 1H, J= 5,1 Hz; 5'OH); 3,86 (m, 1H, 3'H); 3,70 (m, 1H, 4'H); 3,57 (m, 2H, 5'H); 2,40 (m, 1H, 2'Hβ); 2,27 (m, 1H, 2H_α);

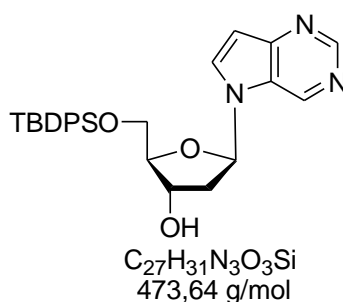
¹³C NMR: δ [ppm] (100,62 MHz, DMSO-*d*₆)

149,4 (C2); 140,9 (C5); 134,4 (C8); 122,8 (C4); 120,2 (C6);

102,9 (C9); 87,6 (C1'); 70,1 (C3'); 61,2 (C4'); 41,2 (C2'); 39,7 (C5');

MALDI: m/z 235,23 (M+H)⁺

1-(2'-Desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl)- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-9-deaza-purin 130



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,80 g (3,4 mmol) 1-(2'-Desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-9-deaza-purin wurden in 20 ml abs. Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt. 1,0 ml (3,8 mmol) *t*-Butyldiphenylsilyl-chlorid wurden innerhalb von 30 Minuten zugetropft. Die Reaktionslösung wurde dann 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Produkt auf Kieselgel adsorbiert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 95:5. Das Produkt wurde als gelbes Öl erhalten.

Ausbeute: 1,22 g (76 %)

DC: R_f=0,25 (CH₂Cl₂ / 95:5)

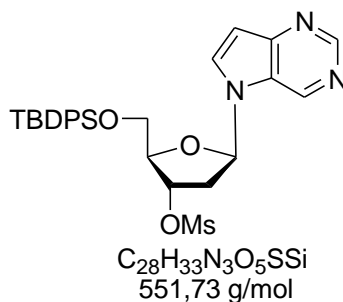
¹H-NMR: δ [ppm] (300 MHz, DMSO-*d*₆)

9,22 (s, 1H, 2H); 8,90 (s, 1H, 6H); 8,07 (d, 1H, J=3,3 Hz; 8H); 7,68-7,31 (m, 12H, H_{Ar}); 6,69 (d, 1H, J=3,3 Hz; 9H); 6,60 (pt, 1H, J_{1'H,2'H β} =7,1 Hz; J_{1'H,2'H α} =6,5 Hz; 1'H); 5,48 (d, 1H, J=4,1 Hz; 3'OH); 4,32 (m, 1H, 3'H); 3,95 (m, 1H, 4'H); 3,80 (m, 2H, 5'H); 2,85 (m, 1H, 2'H β); 2,73 (m, 1H, 2H α); 0,95 (s, 9H, *t*-Bu);

ESI(+): m/z 474,2 (M+H)⁺

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)
 150,7 (C2); 141,8 (C5); 135,5 (C8); 129,8 (C4); 137,5 (C_{Ar}); 135,8 (C_{Ar}); 135,6 (C_{Ar}); 135,2 (C_{Ar}); 134,8 (C8); 133,0 (C_{Ar}); 132,2 (C_{Ar}); 129,8 (C_{Ar}); 128,5 (C_{Ar}); 128,2 (C_{Ar}); 128,1 (C_{Ar}); 127,9 (C_{Ar}); 127,5 (C_{Ar}); 126,9 (C2); 111,2 (C9); 103,1 (C3); 95,7 (C5); 93,6 (C7); 83,5 (C1'); 83,3 (C4'); 65,3 (C3'); 64,2 (C5'); 36,0 (C2'); 25,73 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 20,5 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 19,5 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 14,5 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$);

1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-3'-O-mesyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)-9-deaza-purin 66



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,58 g (1,2 mmol) 1-(2'-Desoxy-5'-O-*tert*-butyldiphenylsilyl- β -D-erythro-pentofuranosyl)-9-deaza-purin wurden in 50 ml eines Gemisches aus abs. Methylenchlorid / Pyridin 4:1 gelöst. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und mit 1,9 ml (24 mmol) MsCl versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml Methanol gequencht und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das verbleibende Öl wurde mit Methylenchlorid versetzt und einmal mit Wasser extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,64 g (96 %)

DC: $R_f=0,35$ (CH_2Cl_2 / 95:5)

^1H -NMR: δ [ppm] (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

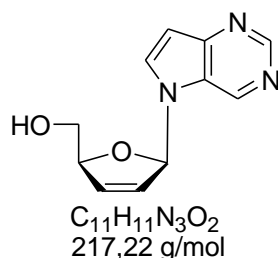
9,02 (s, 1H, 2H); 8,76 (s, 1H, 6H); 8,07 (d, 1H, J=3,3 Hz; 8H); 7,58-7,01 (m, 12H, H_{Ar}); 6,59 (d, 1H, J=3,3 Hz; 9H); 6,45 (pt, 1H, J_{1'H,2'Hβ}=7,0 Hz; J_{1'H,2'Hα}=6,4 Hz; 1'H); 4,23 (m, 1H, 3'H); 3,86 (m, 1H, 4'H); 3,77 (m, 2H, 5'H); 3,07 (s, 3H, SCH₃) 2,77 (m, 1H, 2'H_β); 2,68 (m, 1H, 2H_α); 0,85 (s, 9H, *t*-Bu);

ESI(+): m/z 552,2 (M+H)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 60,95% H: 6,03% N: 7,62%

Gefunden: C: 60,76% H: 5,93% N: 7,35%

1-(2',3'-Didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-9-deaza-purin 67



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

0,72 g (1,3 mmol) 1-(2'-desoxy-5'-O-*tert*-buthyldimethylsilyl-3'-O-mesyl-β-D-*erythro*-pentofuranosyl)-9-deaza-purin wurden in 40 ml abs. THF gelöst und mit 4,84 ml (4,84 mmol) einer 1 M *tetra*-Butylamoniumfluorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden unter Argon bei 50°C gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte zwei Mal durch FC mit dem Elutionsmittel: 1.Chloroform:Methanol/98:2; 2. Chloroform:Methanol/95:5. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,26 (93 %)

DC: R_f=0,50 (CH₂Cl₂:MeOH/ 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (4000 MHz, DMSO-*d*₆)

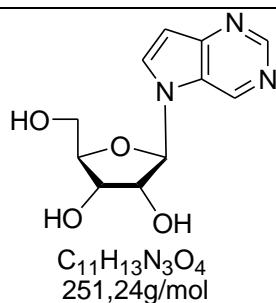
9,23 (s, 1H, 2H); 8,86 (s, 1H, 6H); 8,00 (d, 1H, j=3,3 Hz; 8H); 7,14 (m, 1H, 1'H); 6,68 (d, 1H, J=3,3 Hz; 9H); 6,53 (m, 1H, 2'H); 6,20 (m, 1H, 3'H); 4,94 (t, 1H, J=5,6 Hz; 5'OH); 4,86 (m, 1H, 4'H); 3,54 (m, 2H, 5'H);

MALDI: m/z 218,53 ($M+H$)⁺

El.Analyse: Berechnet: C: 60,82% H: 5,10% N: 19,34%

Gefunden: C: 60,54% H: 5,25% N: 19,27%

1'-Desoxy-1'-(9-deaza-purindolyl)-β-D-ribofuranose 68



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,48g (2,2 mmol) 1-(2',3'-Didesoxy-β-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)-9-deaza-purin wurden mit 0,80g (3,0 mmol) N-Methylmorpholin-4-oxid Monohydrat versetzt und in 30 ml eines Gemisches aus Aceton/Wasser im Verhältnis 8:1 gelöst. Die Lösung wurde mit 2,74 ml einer 2,5%-igen OsO₄-Lösung in *t*-Butanol versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 19 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml 10%-iger wässriger Na₂S₂O₄-Lösung gequencht und nochmals 15 Minuten gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 10 ml Wasser versetzt und mehr Mal mit 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1 Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Ausbeute: 0,24 g (36 %)

DC: R_f=0,18 (CH₂Cl₂ / 9:1)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

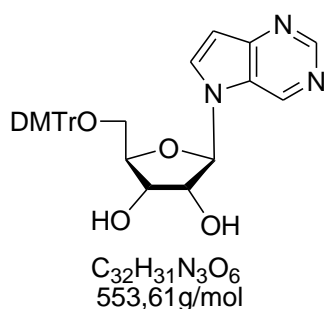
9,22 (s, 1H, 2H); 8,84 (s, 1H, 6H); 8,15 (d, 1H, J=3,3 Hz; 8H); 6,68 (d, 1H, J=3,3 Hz; 9H); 5,96 (d, 1H, J=6,3 Hz; 1'H); 5,53 (s, 1H, 2'OH); 5,32 (s, 1H, 3'OH); 5,25 (t, 1H, J= 4,8 Hz; 5'OH); 4,27 (m, 1H, 2'H); 4,12 (m, 1H, 3'H); 3,98 (m, 1H, 4'H); 3,64 (m, 2H, 5'H);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,62 MHz, DMSO-*d*₆)

150,50 (C2); 139,88 (C2); 133,63 (C8); 126,70 (C5); 108,22 (C4);
 101,65 (C9); 89,87 (C1'); 85,64 (C3'); 74,48 (C2'); 70,18 (C2');
 61,22 (C5');

ESI(+): m/z 252,0 (M+H)⁺

**5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(9-deaza-purinolyl) -β-D-
 ribofuranose 132**



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,30 g (1,2 mmol) 1'-Desoxy-1'-(9-deaza-purinolyl)-β-D-ribofuranose wurden in 15 ml abs. Pyridin gelöst und mit 0,24 ml (1,8 mmol) Triethylamin und 0,49 g (1,45 mmol) 4,4'- Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 48 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3ml Methanol gequencht und mit gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung versetzt. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt wurde zwei Mal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 95:5. Das Produkt wurde als gelber Schaum erhalten.

Ausbeute: 0,36 g (54 %)

DC: R_f= 0,25 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

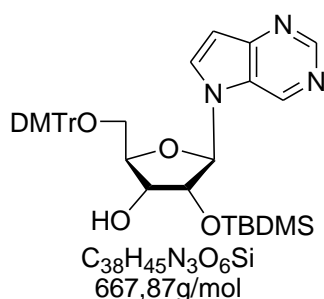
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

9,20 (s, 1H, 2H); 8,80 (s, 1H, 6H); 8,08 (d, 1H, J=3,3 Hz; 8H); ; 7,46-
 6,82 (m, 15H, H_{Ar}); 5,92 (d, 1H, J=5,2 Hz; 1'H); 5,50 (d, 1H, J=6,1
 Hz; 2'OH); 5,20 (d, 1H, J=5,6 Hz; 3'OH); 4,34 (m, 1H, 2'H); 4,15 (

m, 1H, 3'H); 4,06 (m, 1H, 4'H); 3,72 (s, 6H, OCH₃); 3,23 (m, 2H, 5'H);

ESI(+): m/z 554,4 (M+H)⁺

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (9-deaza-purinolyl) -β-D-ribofuranose 70



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 0,41 g (0,74 mmol) 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 1'-desoxy-1'-(9-deaza-purinolyl) -β-D-ribofuranose wurden in 10 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 151 mg (0,89 mmol) Silbernitrat und 1,04 ml (1,04 mmol) einer 1 M *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zwei Mal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte über präp. HPLC (*MN Nucleoprep 100-20* von *Macherey-Nagel*, *n*-Hexan:MeOAc/1:6). Das Produkt (*slow-Isomer*)

Ausbeute: 0,16 g (32 %)

DC: R_f=0,45 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

9,21 (s, 1H, 2H); 8,78 (s, 1H, 6H); 8,12 (d, 1H, J=3,3 Hz; 8H); 7,47-6,81 (m, 13H, H_{Ar}); 6,59 (d, 1H, J=3,4 Hz; 3H); 5,95 (d, 1H, J=6,2 Hz; 1'H); 5,11 (d, 1H, J=5,2 Hz; 3'OH); 4,49 (m, 1H, 2'H); 4,11 (m,

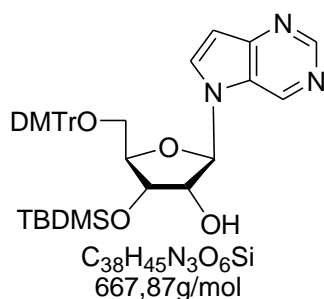
2H, 4'H, 3'H); 3,74 (s, 6H, OCH₃); 3,30 (m, 2H, 5'H); 0,71 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0,13 (s, 3H, SiCH₃); -0,27 (s, 3H, SiCH₃);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,61 MHz, DMSO-*d*₆)

157,10 (d, J=41,4 Hz; C₄); 143,34 (DMTr); 142,19 (DMTr); 136,24 (DMTr); 135,80 (DMTr); 130,25 (C_{Ar}); 128,29 (DMTr); 127,21 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 125,80 (DMTr); 124,26 (DMTr); 122,00 (C_{Ar}); 116,61 (C_{Ar}); 113,16 (C_{Ar}); 108,80 (C_{Ar}); 103,00 (C_{Ar}); 99,88 (DMTr); 86,22 (C1'); 76,12 (C4'); 72,25 (C2'); 70,70 (C3'); 126,58 (C7); 125,27 (C8); 121,38 (C6); 108,10 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1'); 84,88 (C4'); 73,90 (C2'); 70,21 (C3'); 64,42 (C5'); 55,47 (OCH₃); 26,10 (SiC(CH₃)₃), 18,34 (SiC(CH₃)₃); -4,03 (SiCH₃); -5,06 (SiCH₃);

ESI(+): m/z 668,34 (M+H)⁺

5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (9-deaza-purinolyl) -β-D-ribofuranose 71



5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 3'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (9-deasapurinoyl) -β-D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt (*fast-Isomer*) bei der Synthese von 5'-O- (4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)- 2'-O-*tert*.-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1' - (9-deaza-purinolyl) -β-D-ribofuranose.

Ausbeute: 0,15 g (32 %)

DC: R_f=0,43 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆)

9,22 (s, 1H, 2H); 8,76 (s, 1H, 6H); 8,10 (d, 1H, J=3,3 Hz; 8H); 7,45-6,80 (m, 13H, H_{Ar}); 6,57 (d, 1H, J=3,4 Hz; 3H); 5,94 (d, 1H, J=6,2 Hz; 1'H); 5,11 (d, 1H, J=5,2 Hz; 3'OH); 4,48 (m, 1H, 2'H); 4,10 (m,

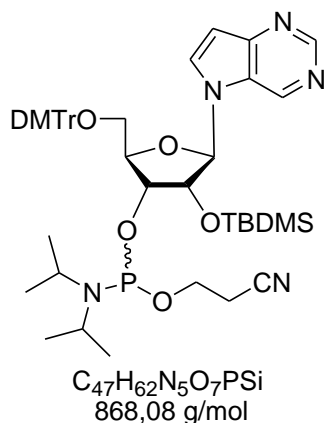
2H, 4'H, 3'H); 3,73 (s, 6H, OCH₃); 3,29 (m, 2H, 5'H); 0,70 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0,13 (s, 3H, SiCH₃); -0,25 (s, 3H, SiCH₃);

¹³C NMR: δ [ppm] (100,61 MHz, DMSO-*d*₆)

158,08 (d, J=41,4 Hz; C₄); 144,31 (DMTr); 142,14 (DMTr); 136,14 (DMTr); 135,68 (DMTr); 130,25 (C_{Ar}); 128,29 (DMTr); 127,21 (C_{Ar}); 126,62 (DMTr); 125,80 (DMTr); 124,26 (DMTr); 122,00 (C_{Ar}); 116,61 (C_{Ar}); 113,16 (C_{Ar}); 108,90 (C_{Ar}); 103,00 (C_{Ar}); 99,88 (DMTr); 86,22 (C1'); 76,12 (C4'); 72,25 (C2'); 70,70 (C3'); 126,58 (C7); 125,27 (C8); 121,38 (C6); 108,10 (C5); 102,16 (C9); 97,13 (C3); 89,04 (C1'); 84,88 (C4'); 73,90 (C2'); 70,21 (C3'); 64,42 (C5'); 55,47 (OCH₃); 26,08 (SiC(CH₃)₃), 18,32 (SiC(CH₃)₃); -4,04 (SiCH₃); -5,10 (SiCH₃);

ESI(+): m/z 668,34 (M+H)⁺

3'-O-(Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1'-desoxy-5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(9-deaza-purinolyl)-β-D-ribofuranose 72



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt. 156 mg (0,23 mmol) 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1'-desoxy-1'-(9-deaza-purinolyl)-β-D-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 520 μl (3,9 mmol) *sym*. Collidin und 14 μl (0,18 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde in einem Eisbad auf

0°C abgekühlt und 78 µl (0,35 mmol) 2-Cyanoethyldiisopropylchlorphosphoramidit zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde drei Mal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch Säulenchromatographie mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 150 mg (73 %)

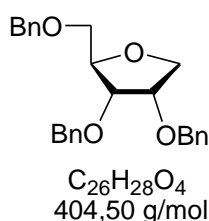
DC: R_f=0,58; 0,50 (CH₂Cl₂:MeOH/ 95:5)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
7,41-6,53 (m, 36H, H_{Ar}); 5,91 (d, J=7,8 Hz ; 2H, 1'H); 4,62 (m, 2H, 3'H); 4,20 (m, 2H, 2'H); 3,73; 3,71 (s, 12H, OCH₃); 3,51 (m, 6H, 5'H, CH₂CN); 3,23 (m, 2H, 3'H); 2,62 (m, 4H, OCH₂); 1,18 (m, 12H, CH(CH₃)₂); 0,78; 0,75 (m, 18H, SiC(CH₃)₃); -0,22; -0,24; -0,46; -0,48 (s, 12H, SiCH₃);

³¹P-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)
150,81 und 148,92 (Verhältnis 1: 4,2);

ESI(+): m/z 869,05 (M+H)⁺

2,3,5-Tri-O-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose 74



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,0 g (2,4 mmol) 2,3,5-Tri-O-benzyl-ribofuranose wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 0,6 ml (9,6 mmol) Triethylsilan und 0,6 ml (4,8 mmol) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1,5 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung gequenchet. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel *n*-Hexan/Ethylacetat 4:1. Das Produkt wurde als farbloses Öl erhalten.

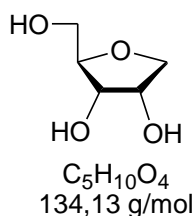
Ausbeute: 850 mg (88,4 %)

DC: $R_f = 0,49$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (270 MHz, DMSO-d_6)
7.29 – 7.17 (m, 15H, H_{ar}); 4.58 – 4.41 (m, 6H, CH_2 -benzyl); 4.09 (m, 1H, 4H); 3.89 (m, 4H, 1H, 2H, 3H); 3.50 (m, 2H, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)
138.05 (C_{Ar}); 137.88 (C_{Ar}); 137.80 (C_{Ar}); 128.25 (C_{Ar}); 128.21 (C_{Ar}); 128.18 (C_{Ar}); 127.80 (C_{Ar}); 127.72 (C_{Ar}); 127.61 (C_{Ar}); 127.49 (C_{Ar}); 127.42 (C_{Ar}); 80.35 (C4); 78.18 (C1); 76.42 (C2); 73.28 (CH_2 -benzyl), 72.05 (CH_2 -benzyl), 71.66 (CH_2 -benzyl); 70.45 (C3); 69.93 (C5).

ESI(+): m/z 422,2 ($\text{M} + \text{NH}_4$)⁺

1-Desoxy-D-ribofuranose 75

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

3,9 g (9,6 mmol) 2,3,5-Tri-O-benzyl-1-desoxy-D-ribofuranose wurden in 70 ml abs. Ethanol gelöst und mit 35 ml Cyclohexen und 800 mg Palladiumhydroxid (20%) auf Kohle versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde der Palladium-Katalysator über Celite abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 9:1. Das Produkt wurde als farbloser Feststoff erhalten.

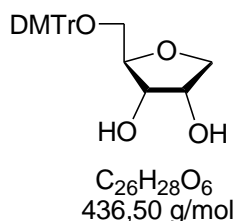
Ausbeute: 1,23 g (95,3 %)

DC: $R_f = 0,22$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d_6)
4.69 (m, 2H, 2-OH, 3-OH); 4.57 (t, $J = 5,7$ Hz; 1H, 5-OH); 3.96 (m, 1H, 4H); 3.83 (m, 1H, 2H); 3.74 (q, $J = 5,5$ Hz; 1H, 3H); 3.52 (m, 3H, 1H, 5H); 3.35 (m, 1H, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d_6)
83.20 (C4), 71.99 (C1); 71.55 (C2); 70.41 (C3); 61.76 (C5)

ESI(-): m/z 133,0 (M-H^-)

5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1-desoxy-D-ribofuranose 76

Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

1,22 g (9,1 mmol) 1-Desoxy-D-ribofuranose wurden in 40 ml abs. Pyridin gelöst und mit 1,9 ml (19 mmol) Triethylamin und 3,7 g (10,9 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 4 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Methanol gequencht und mit gesättigter wässriger $NaHCO_3$ -Lösung versetzt. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 98:2. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 3,41 g (85,9 %)

DC: $R_f = 0,13$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2)

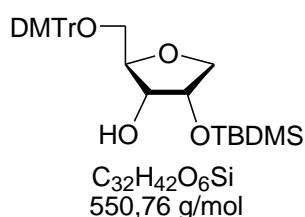
1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, $DMSO-d_6$)
7.42-6.86 (m, 13H, H_{Ar}); 4.77 (d, $J = 4,5$ Hz; 1H, 2OH); 4.73 (d, $J = 6,2$ Hz; 1H, 3OH); 4.01 (m, 1H, 2H); 3.94 (m, 1H, 1H); 3.77 (m, 2H, 3H, 4H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.60 (dd, $J = 8,9$ Hz; $J = 3,1$ Hz; 1H, 1H); 3.02 (m, 2H, 5H)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, $DMSO-d_6$)

158.02 (DMTr); 145.06 (DMTr); 135.79 (DMTr); 129.70 (DMTr); 127.74 (DMTr); 126.58 (DMTr); 113.14 (DMTr); 85.15 (DMTr); 80.97 (C4); 72.50 (C1); 72.24 (C2); 70.30 (C3); 64.45 (C5); 55.01 (OCH₃)

ESI(-):m/z 435,2 (M-H)⁻

5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose 78



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

3,2 g (7,3 mmol) 5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-1-desoxy-D-ribofuranose wurden in 60 ml eines 1:1 Gemisches aus THF/Pyridin gelöst und mit 1,5 g (13,3 mmol) Silbernitrat und 10,2 ml (10,2 mmol) einer 1 M *tert*-Butyldimethylsilylchlorid-Lösung in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde 20 Stunden bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml einer gesättigten wässrigen NaHCO₃-Lösung gequencht. Das entstandene Silberchlorid wurde über Celite abgetrennt und das Filtrat dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde zweimal mit Toluol koevaporiert. Die Aufreinigung erfolgte durch FC mit Methylenchlorid als Elutionsmittel. Das Produkt wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 2,43 g (60,3 %)

DC: R_f = 0,43 (CH₂Cl₂)

¹H-NMR: δ [ppm] (250 MHz, DMSO-d₆)

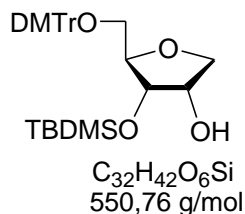
7.40 - 6.83 (m, 13H, H_{Ar}); 4.49 (d, $J = 6,0$ Hz; 1H, 3OH); 4.19 (m, 1H, 2H); 3.96 (m, 1H, 1H); 3.77 (m, 2H, 3H, 4H); 3.73 (s, 6H, OCH_3); 3.58 (m, 1H, 1H); 3.00 (m, 2H, 5H); 0.88 (s, 9H, $SiC(CH_3)_3$); 0.07 (s, 3H, $SiCH_3$); 0.06 (s, 3H, $SiCH_3$)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100,6 MHz, $DMSO-d_6$)

158.05 (DMTr); 145.09 (DMTr); 135.75 (DMTr); 129.73 (DMTr); 127.78 (DMTr); 127.73 (DMTr); 127.42 (DMTr); 126.51 (DMTr); 113.16 (DMTr); 85.17 (DMTr); 80.92 (C4); 73.56 (C1); 72.57 (C2); 70.24 (C3); 64.33 (C5); 55.05 (OCH_3); 25.88 ($SiC(CH_3)_3$); 18.11 ($SiCH_3$); -4.54 ($SiCH_3$); -4.87 ($SiCH_3$)

ESI(-):m/z 549,4 (M-H) $^-$

5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose 77



5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-3-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose entstand als Nebenprodukt bei der Darstellung von 5-O-(4,4'-Dimethoxy-triphenylmethyl)-2-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose.

Ausbeute: 1,1 g (27,3 %)

DC: $R_f = 0,64$ (CH_2Cl_2)

1H -NMR: δ [ppm] (250 MHz, $DMSO-d_6$)

7.42 - 6.82 (m, 13H, H_{Ar}); 4.53 (d, $J = 4,7$ Hz; 1H, 2OH); 4.17 (q, $J = 4,4$ Hz; 1H, 2H); 3.95 (m, 1H, 1H); 3.89 (m, 1H, 3H); 3.79 (m, 1H, 4H); 3.72

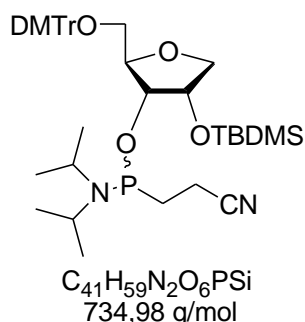
(s, 6H, OCH₃); 3.57 (m, 1H, 1H); 3.02 (m, 2H, 5H); 0.72 (s, 9H, SiC(CH₃)₃); -0.04 (s, 3H, SiCH₃); -0.15 (s, 3H, SiCH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (62,9 MHz, DMSO-d₆)

158.07 (DMTr); 144.94 (DMTr); 135.56 (DMTr); 129.68 (DMTr); 127.76 (DMTr); 127.65 (DMTr); 126.61 (DMTr); 113.82 (DMTr); 85.33 (DMTr); 81.42 (C4); 73.36 (C1); 72.13 (C2); 71.77 (C3); 63.85 (C5); 54.99 (OCH₃); 25.61 (SiC(CH₃)₃); 17.65 SiCH₃; -4.71 (SiCH₃); -5.29 (SiCH₃)

ESI(-): m/z 549,3 (M-H)⁻

3-O-(2-Cyanethoxydiisopropylphosphin)-1-desoxy-5-O-(4,4'-dimethoxy-triphenylmethyl)-2-O-*tert*-butyldimethylsilyl-D-ribofuranose 79



Die Reaktion wurde in einem ausgeheizten Kolben unter Schutzgas durchgeführt.

200 mg (0,36 mmol) 5-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-2-O-*tert*-butyldimethylsilyl-1-desoxy-D-ribofuranose wurden in 11 ml abs. Acetonitril gelöst und mit 480 µl (3,7 mmol) *sym.* Collidin und 15 µl (0,19 mmol) 1-Methylimidazol versetzt. Die Reaktionslösung wurde mit einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und 122 µl (0,54 mmol) 2-Cyanethyl-diisopropylchlorphosphoramidit zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde 15 Minuten bei 0°C und 35 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 3 ml gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung gequencht. Es wurde dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten

organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Die Aufreinigung erfolgte durch pDC mit dem Elutionsmittel Methylenchlorid/Methanol 99:1. Das Produkt (ein Gemisch zweier Diastereomere) wurde als weißer Schaum erhalten.

Ausbeute: 130 mg (47,8 %)

DC: $R_f = 0,49; 0,55$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1)

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)
7,40 – 6,72 (m, 34H, H_{Ar}); 4,36, 4,30 (q, $J = 4,9$ Hz; $J = 5,3$ Hz; 2H, 2H);
4,07 (m, 2H, 1H); 4,00 (m, 4H, 3H, 4H); 3,72, 3,71 (s, 12H, OCH_3); 3,46
(m, 6H, 1H, CH_2CN); 3,28 (m, 4H, 5H); 2,53 (m, 4H, OCH_2); 1,05 (m,
12H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 0,85, 0,83 (m, 18H, $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$); 0,05; 0,04; 0,02; 0,01;
(s, 12H, SiCH_3)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (162 MHz, CDCl_3)
149.67 und 149.15 (Verhältnis 1 : 1,3)

ESI(+): m/z 751,1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

10.4 Synthesen und Aufreinigung der Oligonukleotides

10.4.1 Eingesetzte Lösungen

10.4.1.a Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC)

Für RNA-Aufreinigung (Anionenaustauscher-HPLC)

Puffer A: DEPC-Wasser (pH 8,0)

1 ml Diethylpyrocarbonat wurde zu 1000 ml deionisiertem Wasser gegeben und für 12 Stunden stehen gelassen. Die Lösung wurde danach mit ges., wässriger LiOH-Lösung auf pH 8,0 eingestellt und 60 min. bei 121°C autoklaviert.

Puffer B: 1M LiCl-Lösung (pH 8,0)

Es wurden 42,39 g LiOH (1 mol) in 1000 ml DEPC-Wasser gelöst und mit LiOH oder HCl auf pH 8,0 eingestellt.

10.4.1.b UV/VIS-Spektroskopie

Phosphatpuffer: 100ml des Natriumphosphatpuffers wurden durch Lösen von 207 mg (0,577 mmol) *di*-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, 66mg (0,423 mmol) Natriumhydrogenphosphat und 818 mg (14,0 mmol) Natriumchlorid in 100 ml DEPC-Wasser hergestellt. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

10.4.2 Synthese der Oligonukleotiden

Die RNA-Synthesen wurden im 1 µmol Maßstab an einem Synthesizer der Firma PerSeptive Biosystems (Modell Expedite 8905) durchgeführt. Die Synthese wird auf Glaskügelchen mit definierter Porenweite (CPG, engl.: controlled pore glass; 500 Å Porengröße) als fester Phase durchgeführt. Die Standardkupplungszeit von 10 min für RNA-Bausteine wurde für alle modifizierten Nukleotide übernommen. Die RNA-Amiditbausteine wurden in Konzentrationen von 0,1 M eingesetzt. Alle RNA-Oligonukleotid-Synthesen endeten mit Abspaltung der 5'-Dimethoxytritylgruppe. Die Oligonukleotiden wurden durch Behandlung mit konz. Ammoniak/Ethanol 3:1 (bei 55°C, über Nacht) entschützt und vom Träger abgespalten. Nach Sterilfiltration der Lösung, um die Oligonukleotid-Lösung vom CPG-Material zu trennen, wurden die Lösungsmittel durch Vakuumzentrifugation in einer SpeedVac^R entfernt. Zur Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppen wurde der resultierende Feststoff unter sterilen Bedingungen in Triethylamin-Trihydrofluorid-Lösung aufgenommen (Gasparutto, 1992; Westman, 1994). Die Suspension wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Für die anschließende Fällung des nun vollständig entschützten Oligoribonukleotides wurde die Lösung mit *n*-Butanol versetzt und 30 min. bei -80°C gefällt. Anschließend wurde bei 12000 rpm für 30 min. zentrifugiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand vorsichtig abdekantiert und das erhaltene Pellet in 150 µl DEPC-Wasser und 150 µl 1-Methyl-2-pyrrolidinon gelöst. Die entschützte RNA wurde mittels Anionenaustauscher-HPLC aufgereinigt.

10.5 Aufreinigung und Analytik der Oligonukleotide

10.5.1 Aufreinigung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die RNA Oligonukleotide wurden im „Trityl-off“-Modus synthetisiert und mittels Anionenaustauscher-HPLC aufgereinigt. Dazu stand eine HPLC Anlage von JASCO, bestehend aus einer PU-980 Pumpe, LG-980-02-Mixer, UV-970 Detektor,

Säulenofen und Computer zur Verfügung. Als analytische Säule wurde eine Dionex NucleoPac™ PA 100 Säule (250x4 mm) mit einer Flussrate von 1,5 ml/min benutzt. Als präparative Säule wurde eine Dionex NucleoPac™ PA 100 Säule (250x9 mm) mit einer Flussrate von 5 ml/min benutzt. Es wurden lineare Gradienten (von 0% bis 70% Puffer B in A) verwendet (Puffer A: DEPC-Wasser pH 8,0; Puffer B 1 M LiCl pH 8,0).

Die Gradienten wurden so gewählt, dass das Oligonukleotid jeweils nach 15-20 min von der Säule eluiert wurde. Die UV-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Nach erfolgter Trennung wurden die Produktfraktionen über Sephadex PD 10 Säulen mit G25 Material entsalzt. Schließlich wurde die Menge an Oligonukleotid durch Bestimmung der OD₂₆₀-Einheiten ermittelt. Das Produkt wurde durch MALDI-Massenspektrometrie auf seine Reinheit untersucht.

10.5.2 Quantifizierung der Menge an Oligonukleotid

Das Aufgereinigte und entsalzte Oligonukleotid wurde in 1,0 ml dest. Wasser gelöst (Wasser mit DEPC behandelt). Es wurden 10 µl entnommen und in einer 10 mm Quarzküvette mit dest. Wasser (Wasser mit DEPC behandelt) auf 1000 µl aufgefüllt. Die Extinktion (engl.: absorbance) oder optische Dichte bei 260 nm wurde gemessen. Der am Gerät angezeigte Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor (100) multipliziert. Das Ergebnis ist die Ausbeute in OD₂₆₀-Einheiten. Diese lässt sich mittels des molaren Extinktionskoeffizienten in die Konzentration umrechnen.

10.5.3 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden

Aus der Summe der bekannten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide können die molare Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden abgeschätzt werden. Nach Eckstein (Eckstein, 1991) gilt näherungsweise der folgende Zusammenhang:

$$\varepsilon = (8,8 \cdot nT + 7,3 \cdot nC + 11,7 \cdot nG + 15,4 \cdot nA) \cdot 0,9 [1000 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}]$$

n- die Häufigkeit der jeweiligen Basen im Oligonukleotid

Eine exaktere Methode zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten berücksichtigt die Wechselwirkung der Chromophore mit ihren nächsten Nachbarn (Puglisi, 1989; Gray, 1995). Diese bewirkt, dass der Extinktionskoeffizient eines Dinukleotids nicht der Summe der Einzelnukleotide entspricht. Der Extinktionskoeffizient ergibt sich aus zweimal der Summe aller Oligonukleotide, ohne die beiden endständigen Nukleotide.

$$\varepsilon(\text{ACGU}.....) = 2 [\varepsilon(\text{AC}) + \varepsilon(\text{CG}) + \varepsilon(\text{GU}) + \dots] - [\varepsilon(\text{C}) + \varepsilon(\text{G}) + \varepsilon(\text{U}) + \dots]$$

Baustein	RNA	Baustein	RNA
A	15,34	CG	9,39
C	7,60	CU	8,37
G	12,16	GA	12,92
U	10,21	GC	9,19
AA	13,65	GG	11,43
AC	10,67	GU	10,96
AG	12,79	UA	12,52
AU	12,14	UC	8,90
CA	10,67	UG	10,40
CC	7,52	UU	10,11

Tabelle 11.1: Extinktionskoeffizienten für monomere und dimere Nukleotide bei 260 nm nach Puglisi und Tinoco (1989) sowie Gray et al. (1995). Die Werte gelten für 25°C, pH 7,0 und eine Ionenstärke von 0,1.

Die Extinktionskoeffizienten der Indol-Nukleoside wurden bestimmt. Diese liegen nahezu beim Wert des C (variieren zwischen 6,3 bis 6,53). So wurde in diesen Fällen mit den Werten für C gerechnet.

Die Konzentration der Oligonukleotid-Lösung folgt aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz.

$$OD_{260} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

c-die Konzentration in mol/l
d- die Schichtdicke der Küvette
OD₂₆₀-die dimensionslose Extinktion bei 260 nm

10.6 Aufnahme der UV-Schmelzkurven

Die UV-Schmelzkurven wurden in einem Zweistrahl UV-/VIS-Spektralphotometer Cary 1 der Firma Varian mit Peltier-gesteuertem, thermostatisierbarem Küvettenhalter gemessen. Als Puffer diente ein Phosphat-Puffer der Zusammensetzung 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat und 10 mM Natriumdihydrogenphosphat. Die angesetzten Lösungen wurden durch Zugabe der entsprechenden Menge an Salzsäure auf den pH-Wert 7,0 eingestellt. Das verwendete Wasser war mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Zur Messung wurde eine Referenzküvette der Schichtdicke 1 cm mit 1 ml des Puffers gefüllt und in den Referenzstrahl gestellt. Die Probenküvette gleicher Schichtdicke wurde mit dem gleichen Puffer befüllt und nach Einbringen in den Strahlengang wurde ein Nullabgleich bei 350 nm durchgeführt. Nun wurde eine Konzentration von je 2 µM der beiden Stränge, die den Duplex bilden in die Probenküvette pipettiert. Die notwendigen Konzentrationen wurden nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz in OD₂₆₀-Einheiten umgerechnet. Dazu wurde für den berechneten Extinktionskoeffizient des Einzelstranges, für c die gewünschte Konzentration von 2 µM und für die Schichtdicke d 1 cm eingesetzt. Die Oligonukleotide lagen als Stammlösungen in einem bekannten Volumen destilliertem Wasser vor.

Vor Beginn der Messung wurden die Küvetten mit Teflon-Deckeln fest verschlossen, um ein Verdampfen des Lösungsmittels während der Messung zu verhindern. Die Messung begann mit einer Denaturierung. Dazu wurden die Küvetten für 10 min. auf 80°C erhitzt und anschließend mit 5°C/min. renaturiert (Programm „denat.adl“). Es wurde auf die Starttemperatur (0°C bzw. 5°C) abgekühlt und die Temperatur für 10 Minuten gehalten. Die nun folgende Aufnahme der Schmelzkurve bei 260 und 274 nm (Nullabgleich bei 350 nm) wurde mit einer Heizrate von 0,5°C/min. durchgeführt.

Alle 30 Sekunden wurde ein Datenpunkt registriert (Programm „dna2hblk.adl“). Als Temperatur wurde die Temperatur des Probenblocks des Spektrometers angegeben. Dies ist ausreichend exakt (Varian, 1998). Nach beendeter Messung wurden die Daten automatisch aufgezeichnet und die Probe auf 20°C abgekühlt. Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt. Durch die Messung bei zwei verschiedenen Wellenlängen standen so zumindest vier Meßreihen je Duplex zur Verfügung. Die Auswertung der Kurven bezüglich T_m und thermodynamischer Daten ergab keine signifikanten Unterschiede als Funktion der Wellenlänge (260 oder 274 nm). Der T_m wurde sowohl aus $\alpha = f(T)$ Kurven als auch aus der gefitteten Kurve ermittelt. Die Übereinstimmung war gut. Für alle Messungen unterhalb 20°C wurde die Küvettenkammer mit Stickstoff gespült, um Kondensation der Luftfeuchtigkeit auf den Küvettenoberflächen zu vermeiden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Abbildungen der gemessenen Schmelzkurven wurden die Extinktionswerte normiert. Dies geschieht mit Hilfe der folgenden Rechenvorschrift:

$$OD_{\text{normiert}} = (OD(T) - OD_A) / (OD_E - OD_A)$$

Dabei sind OD_A der Anfangs- und OD_E der Endwert der Extinktion.

10.7 CD-Spektroskopie der Oligonukleotide

Die CD-Spektren wurden mit einem JASCO J-710 Spektropolarimeter aufgenommen, das mit einem thermostatisierten (Neslab RTE-100) Küvettenhalter ausgerüstet war. Dazu wurden die gleichen Proben, die zuvor in der UV-Spektroskopie untersucht worden waren, eingesetzt. Als Auswerte-Software stand das Programm Standard Analysis, Version 1.33 (1995) von JASCO zur Verfügung. Zur Messung der wellenlängenabhängigen Spektren wurden jeweils fünf Spektren im Bereich von 350 nm bis 200 nm akkumuliert. Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet: resolution 0,2 nm, scan speed 50 nm/min., response 1 sec. und band width 1,0 nm. Von den so aufgenommenen Spektren wurde immer das bei gleicher Temperatur registrierte Spektrum des Puffers subtrahiert. Anschließend wurden die erhaltenen Kurven per Software geglättet (Befehl: noise reduction).

10.8 Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten wurden die Nukleoside in Wasser gelöst, so daß eine Extinktion der Lösungen zwischen 0,8 und 1,2 erreicht wurde. Von diesen Lösungen wurden jeweils 2 ml mit dem gleichen Volumen 1-Octanol versetzt und für 10 min. intensiv durchmischt. Anschließend wurden die Proben für 10 min. bei 10 000 rpm zentrifugiert und die zwei Phasen getrennt. Es wurden die Extinktionen der wäßrigen und der Octanol Phasen am UV-Spektrometer gemessen. Die Verteilungskoeffizienten $\log P$ wurden nach folgende Gleichung berechnet.

$$\log P = E_{\text{Octanol}} / E_{\text{Wasser}}$$

11 Literaturverzeichnis

Avery, O. T. at all. "Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, **1944**, 79, 137-158

Balzarini, J.; Baba, M.; Pauwels, R.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. "Anti-retrovirus activity of 3'-fluoro- and 3'-azido-substituted pyrimidine 2',3'-dideoxynucleoside analogues" *Biochem. Pharmacol.*, **1988**, 37, 2847-2856

Batey, R. T.; Rambo, R. T.; Doudna, J. A. "Tertiäre Motive bei Struktur und Faltung von RNA" *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2472-2491

Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A., "A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for determining atom-centered charges: The RESP model" *J Phys Chem* **1993**, 97, 10269-10280.

Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H. "Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis" *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 1859-1862

Bergstrom, D.E.; Ruth, J.L.; Reddy, P.A.; De Clercq, E. "Synthesis of (E)-5-(3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2'-deoxyuridine and related analogues: Potent and unusually selectiv antiviral activity of (E)-5-(3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2'-deoxyuridine against herpes simplex virus typ 1" *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 279-284

Bergstrom, D.E.; Swartling, D.J. "Fluorine substituted analogs of nucleic acid components" *Mol. Struct. Energ.*, **1988**, 8, 259-308

Blackburn, G. M.; Gait, M. J. "Nucleic Acids in Chemistry and Biology" *IRL Press* **1992**, ISBN 0-19-963121-2

Blackburn, G.M.; Gait, M.J. "Nucleic acids in chemistry and biology" 2nd edition, Oxford University Press, Oxford New York Tokyo, **1996**

Blackburn, G.M.; Perrée, T.D.; Rashid, A.; Bisbal, C.; Lebleu, B. "Isosteric and isopolar analogs of nucleotides" *Chemica Scripta*, **1986**, 26, 21-24

Bouzida, D.; Kumar, S.; Swendsen, R. H., "Efficient Monte Carlo methods for the computer simulation of biological molecules" *Phys Rev A* **1992**, 45 (12), 8894-8901.

Bragg. W.H.; Bragg, W.C. "The reflection of X-rays by crystals" *Proc. Roy. Soc. London*, **1913**, (A) 88, 428-438

Brown, D. M.; Todd, A. R. "Nucleotides, part X. Some observations on structure and chemical behaviour of nucleic acids" *J. Chem. Soc.*, **1952**, 52-58

Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L.; Dodds, D.L.; Fisher, E.F.; McBride, L.J.; Matteucci, M.; Stabinski, Z.; Tang, J.-Y. "Chemical synthesis of deoxynucleotides by the phosphoramidite method" *Methods Enzymol.*, **1987**, 154, 287-313

Case, D. A.; Cheatham, T. E., 3rd; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M., Jr.; Onufreiv, A.; Simmerling, C.; Woods, R. J., "The Amber biomolecular simulation programs" *J. Comput. Chem.* **2005**, 26 (16), 1668-1688

Chargaff, E. "Some recent studies on the composition and structure of nucleic acids" *Nature* **1951b**, 38 (S1), 41-59

Chargaff, E. Structure and function of nucleic acids as cell constituents, *Fed. Proc.*, **1951a**, 10, 654-659

Cheng, D.M.; Kan, L.S.; Ts'ó, P.O.P.; Uesugi, S.; Takatsuka, Y.; Ikehara, M. "Multinuclear magnetic resonance studies of monomers and dimers containing 2'-fluoro-2'-deoxyadenosine" *Biopolymers*, **1983**, 22, 1427-1444

Cornell, W. D.; Cieplak, C. I.; Bayly, I. R.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A., "A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules" *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179-5197

Couzin, J. "Breakthrough of the Year: Small RNAs Make Big Splash" *Science* **2002**, *298*, 2296

Crick, F. H. C. "On protein synthesis" *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138-163

Darden, T.; York, D.; Pedersen, L., Particle Mesh Ewald "A Nlog(N) Method for Ewald Sums in Large Systems" *J Chem Phys* **1993**, *98*, 10089-10092.

Dunitz, J. D. "Perspectives in Supramolecular Chemistry: The Crystall as a Supramolecular Entity" *Wiley, Chichester*, **1996**, 1-30

Edelhoch, H.; Osborne, J. C. J. "The therodynamic basis of the stability of proteins, nucleic acids, and membranes" *Adv. Protein Chem.* **1976**, *30*, 183-250

Engels, J. W.; Parsch, J. "Nucleic Acid Drugs" *Molecular Biology in Medicinal Chemistry* **2004**, 153-178

Falk, M.; Hartman, K.A. Jr.; Lord, R.C. "Hydration of deoxyribonucleic acid. II. An infrared study" *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 387-391

Famulok, M. "Oligonukleotide aptamers that recognize small molecules" *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 324-329

Franklin, R. E.; Gosling, R. G. "Evidence for 2-chain helix in crysalline structure of sodium deoxyribonucleate" *Nature* **1953**, *171*, 740-741

Furneaux R. H.; Tyler P.C.; "Improved Syntheses of 3H,5H-Pyrrolo[3,2-d]pyrimidines" *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 8411-8412

Gallicchio, E.; Kubo, M.M.; Levy, R.M. "Entropy-enthalpy compensation in solvation and ligand binding revisited" *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 4526-4527

Gessner, R. V.; Frederick, C. A.; Quigley, G. J.; Rich, A.; Wang, A. W.-J. "The Molecular Structure of the Left-handed Z-DNA Double Helix at 1,0 Å Atomic Resolution" *J. Biol. Chem.* **1989**, 264 (14), 7921-7935

Gray, D.M.; Ratliff, R.L.; Vaughan, M.R. "Circular dichroism spectroscopy of DNA" *Methods Enzymol.*, **1992**, 211, 389-406

Hakimelahi, G.H.; Proba, Z.A.; Ogilvie, K.K. "New catalysts and procedures for the dimethoxytritylation and selective silylation of ribonucleosides" *Can. J. Chem.*, **1982**, 60, 1106-1113

Hartmann, G.; Endres, S. "Therapeutische Oligonucleotide" *Deutsches Ärzteblatt* **2003**, 100 (47), A3102-A3108

Hendrix, C.; Rosemeyer, H.; de Bouvere, B.; van Aerschot, A.; Seela, F.; Herdewijn, P. "1'-5'-Anhydrohexitol oligonucleotides: hybridization and strand displacement with oligoribonucleotides, interaction with RNase H and HIV-reverse transcriptase" *Chemistry Eur. J.* **1997**, 3, 1513-1520

Holbrook, S. R. "RNA structure and function" *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Hrsg.: Simons, R. W.; Grunberg-Manago, M.; Cold Spring Harbor, NY **1998**, 147-174

Ikehara, M. "2'-Substituted 2'-deoxypurinenucleotides, their conformation and properties" *Heterocycles*, **1984**, 21, 75-90

Jenkins, I.D.; Verheyden, J.P.H.; Moffatt, J.G. "4'-Substituted nucleosides. 2. Synthesis of the nucleoside antibiotic nucleocidin" *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 3346-3357

Joecks, A.; Koppel, H.; Schleinitz, K.D.; Cech, D. "NMR- spectroscopic studies of the conformational behavior of some 2' and 3'- halogeno-substituted pyrimidine nucleosides" *J. Prakt. Chem.*, **1983**, 325, 881-892

Jones, S.J.; Reese, C.B. "Migration of *t*-butyldimethylsilyl protecting groups" *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1979**, 2762-2764

Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.; Klein, M. L., Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* **1983**, 79, 926-935.

Biffinger J. C., Kim H. W.; DiMagno S. G., „The Polar Hydrophobicity of Fluorinated Compounds” *ChemBioChem* **2004**, 5, 622-627

Karas, M.; Hillenkamp, F “Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons” *Anal. Chem.* **1988**, 60, 2299-2301

Khorana, H. G. “Polynucleotide synthesis and the genetic code” *Fed. Proc.* **1965**, 24, 1473-1487

Klöpffer, A. “Die Synthese 2'-Aminoalkyl substituierter, fluorierter Nukleosidanaloga und ihr Einfluss auf die katalytische Aktivität von anti-HIV Hammerhead Rbozymen” *Dissertation* **2004**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Lander. E. S. at al. “Initial sequencing and analysis of the human genome” *Nature* **2001**, 409, 860-921

Letsinger, R.L.; Finnan, J.L.; Heaver, G.A.; Lunsford, W.B. “Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links” *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, 97, 3278-3279

Letsinger, R.L.; Lunsford, W.B. “Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates” *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 3655-3661

Loakes, D.; Brown, D.M.; Linde, S.; Hill, F. “3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR” *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 2361-2366

Loakes, D.; Hill, F.; Brown, D.M. “Salisbury, S.A.; Stability and structure of DNA oligonukleotides containing non-specific base analogues” *J. Mol. Biol.*, **1997**, 270, 426-435

Marky, L.A.; Breslauer, K.J. “Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves” *Biopolymers*, **1987**, 26, 1601-1620

Merrifield, R.B.; Solid phase peptide synthesis. I. “The synthesis of a tetrapeptide” *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154

Neilson, T.; Werstiuk, E.S. "Oligoribonucleotide synthesis. II. Preparation of 2'-O-tetrahydropyranyl derivatives of adenosine and cytidine necessary for insertion in stepwise synthesis" *Can. J. Chem.*, **1971**, 49, 493-499

Nichols D.E, Kurrash-Orbaugh D., Marona-Lewicka D., Cumbay M.G., Watts V.J., Barker E.L., Blair B.J.; "Effect of Ring Fluorination on the Pharmacology of Hallucinogenic Tryptamines" *J.Med. Chem. Soc.* **2000**, 43, 4701-4710

Nichols, R.; Andrews, P.C.; Zhang, P.; Bergstrom, D.E. "A universal nucleoside for use at ambiguous site in DNA primers" *Nature*, **1994**, 369, 492-493

Nirenberg, M. W.; Matthei, J. H.; Jones, O. W.; Martin, R. G. Baronades, S. H. "Approximation of genetic code via cell-free protein synthesis directed by template RNA" *Fed. Proc.* **1963**, 22, 55-61

Ochoa, S. "Synthetic polynucleotides and the genetic code" *Fed. Proc.* **1963**, 22, 62-74

Ogilvie, K.K.; Beaucage, S.L.; Schiffman, A.L.; Theriault, N.Y.; Sadana, K.L. "The synthesis of oligoribonucleotides. II. The use of silyl protecting groups in nucleoside and nucleotide chemistry" *Can. J. Chem.*, **1978b**, 56, 2768-2780

Ogilvie, K.K.; Sadana, K.L. "Thompson, E.A.; The use of silyl groups in protecting the hydroxyl functions of ribonucleosides" *Tetrahedron Lett.*, **1974a**, 2861-63

Olby, R. "Quiet debut for the double helix" *Nature* **2003**, 421(23), 402-405

Pankiewicz, K.W. "Fluorinated nucleosides" *Carbohydr. Res.*, **2000**, 327, 87-105

Parsch, J.; Engels, J. W. "C-F...H-C Hydrogen Bonds in Ribonucleic Acids" *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5664-5672

Pauling, L.; Corey, R. B. "Structure of the nucleic acids" *Nature* 1953b, 171, 346

Pauling, L.; Corey, R. B. "A proposed structure for the nucleic acids" *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1953a**, 39, 84-97

Puglisi, E. V.; Puglisi, J. D. „RNA structure and function“ *CSHL Press*, Hrsg.:Simons, R. W.; Grunberg-Manago, M.; Cold Spring Harbor, NY **1998**, 117-146

Puglisi, J.D.; Tinoco, I. “Absorbance melting curves of RNA” *Methods Enzymol.*, **1989**, 180, 304-325

Rolland V., Kotera M., Lhomme J; Convenient “Preparation of 2-Deoxy-3,5-di-O-*p*-toluoyl- α -D-erythro-pentofuranosyl Chloride” *Synthetic Comm.*, **1997**, 27 (20), 3505-3511

Rosa F.A.F., Rabelo R.A., Nascimento M.G.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, 1, 11-18

Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C.,”Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular Dynamics of n-Alkanes” *J Comput Phys* **1977**, 23, 327-341.

Saenger, W. “Principles of nucleic acid structure” Springer Verlag, New York, Berlin, **1984**

Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H.G. “Studies on polynucleotides. XXIV. The stepwise synthesis of specific deoxyribonucleotides (4). Protected derivatives of deoxyribonucleosides and new syntheses of deoxyribonucleoside-3'-phosphates” *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3821-3827

Schweitzer, B.A.; Kool, E.T. “Aromatic nonpolar nucleosides as hydrophobic isosteres of pyrimidine and purine nucleosides” *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 7238-7242

Searle, M.S.; Williams, D.H. “On the stability of nucleic acid structures in solution: enthalpy-entropy compensations” internal rotations and reversibility, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, 21, 2051-2056

Seela F., Bourgeois “Synthesis of Indole 2',3'-Dideoxyribonucleosides” *Synthesis*, **1990**, 945-950

Seela, F.; Bourgeois, W.; Rosemeyer, H.; Wenzel, T. “Synthesis of 4-substituted 1H benzimidazole 2'-deoxyribonucleosides and utility of the 4-nitro compound as universal base” *Helv. Chim. Acta*, **1996**, 79, 488-498

Sinha, N.D.; Biernat, J.; Köster, H. "β-Cyanoethyl *N,N*-dialkylamino/*N*-morpholinomono-chloro phosphoamidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides" *Tetrahedron. Lett.*, **1983**, 24, 5843-5846

Sinha, N.D.; Biernat, J.; Köster, H. "β-Cyanoethyl *N,N*-dialkylamino/*N*-morpholinomono-chloro phosphoamidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides" *Tetrahedron. Lett.*, **1983**, 24, 5843-5846

Smith, M.; Rammner, D.H.; Goldberg, I.H.; Khorana, H.G. "Studies on polynucleotides. XIV. Specific synthesis of the C-3'- C-5'-interribonucleotide linkage. Synthesis of uridylyl-(3'- 5')-uridine and uridylyl-(3'- 5')-adenosine" *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, 84, 430-440

Stephenson, M. L.; Zamecnik, P. C: "Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75 (1), 285-288

Stofer, E.; Chipot, C.; Lavery, R., "Free energy calculations of Watson-Crick base pairing in aqueous solution" *J Am Chem Soc* **1999**, 121, 9503-9508.

Stryer, L. "Biochemie" *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, New York, **1991**

Thalladi, V.R.; Weiss, H.C.; Bläser, D.; Boese, R.; Nangia, A.; Desiraju, G.R. "C-H...F interactions in the crystal structures of some fluorobenzenes" *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 8702-8710

Torrie, G. M.; Valleau, J. P., Nonphysical sampling distributions in Monte-Carlo free energy estimation - Umbrella sampling. *J Comp Phys* **1977**, 23, 187-199.

Townsend L.B, Chen J.J., Wie Y., Drach J.C. "Synthesis and Antiviral Evaluation of Trisubstituted Indole *N*-Nucleosides as Analogues of 2,5,6-Trichloro-1-(β-D-ribofuranosyl)benzimidazole (TCRB)" *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 2449-2456

Türk, C.;Gold, L. „Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase“ *Science* **1990**, 249, 505-510

Uesugi, S.; Kaneyusa, T.; Imura, J.; Ikehara, M.; Cheng, D.M.; Kan, L.S.; Ts'o, P.O.P. ¹H-NMR studies on the dinucleoside monophosphates containing 2'-halogeno-2'-deoxypurine nucleosides: Effects of 2'-substitutes on conformation" *Biopolymers*, **1983**, 22, 1189-1202

Venter, J. C. et al.„The sequence of the human genome“ *Science* **2001**, 291, 1304-1351

Vogel, H.J.; Bridger, W.A. "Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the methylene and fluoro analogues of adenine nucleotides. Effects of pH and Magnesium ion binding" *Biochemistry*, **1982**, 21, 394-401

Vorbrüggen, H.; Bennua, B. "A new simplified nucleoside synthesis" *Chem. Ber.* **1981**, 114, 1279-1286

Wang, A. H.-J.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J.-L.; van der Marel, G.; Rich, A. „Molecular structure of left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution“ *Nature* **a**

Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A., "Development and testing of a general amber force field" *J Comput Chem* **2004**, 25 (9), 1157-74.

Watson, J. D.; Crick, F. H. C. "Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid" *Nature*, **1953**, 171, 737-738

Watson, J. D.; Crick, F. H. C.; "Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature*" **1953a**, 171, 964-967

Wilkins, M. H. C.; Randall, J.T. "Crystallinity in sperm heads: molecular structure of nucleoprotein *in vivo*" *Biochem. At. Biophys. Acta* **1952**, 10, 192-193

Wilkins, M. H. C.; Seeds, W. E. ; Stokes, A. R.; Wilson, H. R. "Helical structure of crystalline deoxypentose nucleic acid" *Nature* **1953a**, 172, 759-762

Wilkins, M. H. C; Stokes, A. R.; Wilson, H. R: "Molecular structure of deoxypentose nucleic acids" *Nature* **1953b**, 171, 738-740

Wozniak, S. W. J.; "Antisense&Nucleic Acids" *Drug Rev.* **1997**, 7

Zamecnik, P. C.; "Stephenson, M. L. „Inhibition of Rous sarcoma virus RNA replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, 75 (1), 280-284

Živković, A. "RNA Recognition by Fluoro Aromatic Substituted Nucleic Acid Analogues" *Dissertation* **2005**, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main

12 Anhang

Teil A Kristallstrukturen

A1 Fluorierte Indolribonukleoside

A2 1'-Desoxy-1'-(7-*N*-purin)- β -D-ribofuranose

Teil B Ausgewählte Spektren

Teil C Abkürzungverzeichnis

Teil A Kristallstrukturen

A1 Fluorierte Indolribonukleoside

Alle erhaltene Datei befinden sich unter:

http://cisti-incist.nrc-cnrc.gc.ca/irm/unpub_e.shtml. CCDC numbers 631201, 631202, 631203, 631204 und 631205.

A2 1'-Desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose

Krystalldata

7NP

DISCUSSION OF THE STRUCTURE

=====

The structure contains two independent molecules. The conformations of both molecules are very similar. The five-membered furanose ring approximately has a C2-endo envelope conformation for both molecules. The purine groups are essentially planar (mean deviation from plane: 0.008 and 0.009 Å respectively). They adopt an anti orientation about the glycosyl bond with torsion angles $O4-C1-N1-C10 = -59(1)$ and $C2-C1-N1-C10 = 175.6(8)$ for molecule 1 and $O8-C11-N5-C20 = -61.2(9)$ and $C12-C11-N5-C20 = -179.9(8)$ deg for molecule 2. The orientation about the exocyclic C4-C5 bond +sc(gauche, gauche) for both molecules. The molecules are connected by intermolecular O-H...O and O-H...N hydrogen bonds to a three-dimensional network. The crystal packing also shows two intermolecular C-H...N contacts with H...N distances of 2.38 and 2.40 Å and four intermolecular C-H...O interactions with H...O distances between 2.44 and 2.59 Å. The purine groups stack along the a-direction. The distance between the purine planes is about 3.40 Å.

Tabelle 1: hydrogen bonds

O - H	... A	O-H [Å]	H...A [Å]	O...A [Å]	O-H-A [deg]	symmetry
O2 - H2B	... O5	0.84	2.09	2.874(8)	156	x+1, y, z
O3 - H3B	... O4	0.84	1.96	2.788(7)	169	2-x, y-1/2, 1/2-z
O5 - H5C	... N6	0.84	1.99	2.748(8)	149	x, y, z
O6 - H6B	... O9	0.84	2.02	2.815(7)	158	x-1, y, z
O7 - H7A	... N3	0.84	2.18	3.005(8)	166	x-1/2, 3/2-y, 1-z
O9 - H9B	... N2	0.84	2.00	2.801(8)	160	x, y, z

Empirical formula	C10 H12 N4 O4
Formula weight	252.24
Temperature	161(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system, space group	Orthorhombic, P 212121
Unit cell dimensions	a = 6.9512(14) Å alpha = 90 deg. b = 7.767(3) Å beta = 90 deg. c = 38.036(7) Å gamma = 90 deg.
Volume	2053.5(9) Å ³
Z, Calculated density	8, 1.632 Mg/m ³ a
Absorption coefficient	0.129 mm ⁻¹
F(000)	1056
Crystal size	0.55 x 0.15 x 0.08 mm
Theta range for data collection	1.07 to 24.99 deg.
Limiting indices	-8<=h<=8, -9<=k<=9, -44<=l<=44
Reflections collected / unique	16633 / 2134 [R(int) = 0.1451]
Completeness to theta = 24.99	99.9 %
Absorption correction	None
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2134 / 0 / 331
Goodness-of-fit on F ²	1.272
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0900, wR2 = 0.1553
R indices (all data)	R1 = 0.1158, wR2 = 0.1667
Largest diff. peak and hole	0.411 and -0.366 e.Å ⁻³

Table 2. Atomic coordinates (x 10⁵) and equivalent isotropic displacement parameters (Å² x 10⁴) for jelenal0.
U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U_{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
O(5)	47530(80)	42810(70)	28698(13)	187(13)
O(3)	105240(70)	49570(70)	24299(14)	180(13)
N(3)	79590(100)	94920(90)	41793(16)	200(16)
O(2)	109200(80)	35570(70)	31114(13)	176(13)
O(4)	77510(80)	70670(60)	28694(12)	144(12)

N(1)	88390 (100)	67970 (80)	34539 (17)	169 (15)
N(2)	82340 (100)	64770 (90)	40315 (16)	191 (16)
C(6)	85780 (110)	56820 (110)	37250 (20)	204 (19)
C(2)	92260 (110)	44140 (100)	30060 (19)	143 (17)
N(4)	84050 (100)	114130 (80)	36907 (17)	179 (16)
C(10)	86340 (110)	84430 (100)	35971 (19)	139 (18)
C(9)	87170 (110)	100940 (100)	34660 (20)	190 (19)
C(4)	73440 (120)	58900 (100)	25779 (19)	188 (19)
C(3)	87920 (110)	44570 (100)	26142 (19)	129 (17)
C(8)	80270 (120)	110400 (110)	40250 (20)	198 (19)
C(5)	52530 (110)	53490 (100)	25840 (20)	157 (18)
C(7)	82350 (110)	81860 (100)	39520 (19)	132 (17)
C(1)	92500 (120)	63670 (100)	30850 (18)	170 (18)
O(6)	12100 (80)	32560 (70)	44373 (13)	180 (13)
O(8)	44200 (80)	68180 (70)	46209 (13)	196 (13)
O(9)	74450 (70)	43170 (70)	46032 (12)	153 (12)
O(7)	15760 (70)	48140 (80)	50857 (13)	207 (13)
N(5)	32400 (90)	63910 (80)	40533 (15)	122 (14)
N(7)	38740 (100)	90160 (90)	33115 (17)	214 (16)
N(6)	38620 (100)	59850 (90)	34817 (16)	194 (16)
C(19)	31840 (120)	97000 (110)	40220 (20)	211 (19)
N(8)	33690 (100)	109810 (90)	37921 (17)	235 (17)
C(16)	35620 (110)	52730 (100)	37900 (20)	184 (19)
C(12)	28870 (120)	41560 (100)	45267 (19)	154 (17)
C(17)	36940 (110)	77340 (100)	35476 (19)	117 (17)
C(20)	33210 (120)	80380 (110)	39023 (19)	168 (19)
C(15)	69160 (120)	52090 (110)	49210 (20)	198 (19)
C(14)	48160 (120)	57490 (90)	49275 (19)	142 (17)
C(11)	29010 (110)	60490 (90)	44321 (18)	126 (17)
C(18)	36830 (120)	105450 (110)	34540 (20)	240 (20)
C(13)	33310 (110)	43200 (100)	49226 (19)	155 (17)

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [deg] for jelena10.

O(5)-C(5)	1.412 (9)
O(3)-C(3)	1.446 (9)
N(3)-C(8)	1.339 (11)
N(3)-C(7)	1.347 (10)
O(2)-C(2)	1.411 (9)
O(4)-C(1)	1.433 (9)
O(4)-C(4)	1.465 (9)
N(1)-C(6)	1.360 (10)
N(1)-C(10)	1.397 (10)
N(1)-C(1)	1.470 (9)
N(2)-C(6)	1.340 (10)
N(2)-C(7)	1.362 (11)
C(2)-C(3)	1.521 (10)
C(2)-C(1)	1.547 (11)
N(4)-C(8)	1.329 (10)
N(4)-C(9)	1.352 (10)
C(10)-C(9)	1.377 (11)
C(10)-C(7)	1.393 (10)
C(4)-C(3)	1.507 (11)
C(4)-C(5)	1.513 (11)
O(6)-C(12)	1.401 (10)
O(8)-C(11)	1.410 (9)
O(8)-C(14)	1.458 (9)
O(9)-C(15)	1.440 (9)
O(7)-C(13)	1.421 (9)
N(5)-C(16)	1.343 (10)
N(5)-C(20)	1.403 (10)
N(5)-C(11)	1.484 (9)

N(7)-C(18)	1.311(11)
N(7)-C(17)	1.347(10)
N(6)-C(16)	1.315(10)
N(6)-C(17)	1.386(10)
C(19)-N(8)	1.330(11)
C(19)-C(20)	1.371(12)
N(8)-C(18)	1.348(11)
C(12)-C(11)	1.513(11)
C(12)-C(13)	1.542(10)
C(17)-C(20)	1.394(10)
C(15)-C(14)	1.518(11)
C(14)-C(13)	1.516(11)

C(8)-N(3)-C(7)	112.9(6)
C(1)-O(4)-C(4)	109.7(5)
C(6)-N(1)-C(10)	105.9(6)
C(6)-N(1)-C(1)	127.3(7)
C(10)-N(1)-C(1)	126.9(6)
C(6)-N(2)-C(7)	104.8(6)
N(2)-C(6)-N(1)	113.0(8)
O(2)-C(2)-C(3)	117.0(6)
O(2)-C(2)-C(1)	113.5(7)
C(3)-C(2)-C(1)	99.8(6)
C(8)-N(4)-C(9)	118.1(7)
C(9)-C(10)-C(7)	119.5(7)
C(9)-C(10)-N(1)	135.0(7)
C(7)-C(10)-N(1)	105.5(7)
N(4)-C(9)-C(10)	118.0(7)
O(4)-C(4)-C(3)	105.2(6)
O(4)-C(4)-C(5)	110.4(6)
C(3)-C(4)-C(5)	115.8(6)
O(3)-C(3)-C(4)	108.3(6)
O(3)-C(3)-C(2)	108.4(6)
C(4)-C(3)-C(2)	103.8(6)
N(4)-C(8)-N(3)	128.5(7)
O(5)-C(5)-C(4)	114.2(6)
N(3)-C(7)-N(2)	126.3(7)
N(3)-C(7)-C(10)	122.9(7)
N(2)-C(7)-C(10)	110.8(7)
O(4)-C(1)-N(1)	108.6(6)
O(4)-C(1)-C(2)	104.7(6)
N(1)-C(1)-C(2)	114.0(6)
C(11)-O(8)-C(14)	107.9(6)
C(16)-N(5)-C(20)	106.1(6)
C(16)-N(5)-C(11)	129.3(6)
C(20)-N(5)-C(11)	124.5(6)
C(18)-N(7)-C(17)	112.6(7)
C(16)-N(6)-C(17)	103.7(6)
N(8)-C(19)-C(20)	118.6(7)
C(19)-N(8)-C(18)	117.1(7)
N(6)-C(16)-N(5)	114.8(7)
O(6)-C(12)-C(11)	115.6(7)
O(6)-C(12)-C(13)	116.4(6)
C(11)-C(12)-C(13)	98.7(6)
N(7)-C(17)-N(6)	126.6(7)
N(7)-C(17)-C(20)	122.5(7)
N(6)-C(17)-C(20)	110.9(7)
C(19)-C(20)-C(17)	119.6(7)
C(19)-C(20)-N(5)	136.0(7)
C(17)-C(20)-N(5)	104.4(7)
O(9)-C(15)-C(14)	113.1(6)
O(8)-C(14)-C(13)	106.2(6)
O(8)-C(14)-C(15)	109.0(6)

C(13)-C(14)-C(15)	116.9(6)
O(8)-C(11)-N(5)	107.5(6)
O(8)-C(11)-C(12)	107.2(6)
N(5)-C(11)-C(12)	113.9(6)
N(7)-C(18)-N(8)	129.6(8)
O(7)-C(13)-C(14)	112.5(6)
O(7)-C(13)-C(12)	106.1(6)
C(14)-C(13)-C(12)	102.0(6)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^4$) for jelena10.

The anisotropic displacement factor exponent takes the form:

$$-2 \pi^2 [h^2 a^{*2} U_{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U_{12}]$$

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O(5)	180(30)	230(30)	150(30)	0(20)	10(20)	0(30)
O(3)	170(30)	190(30)	180(30)	-20(30)	70(20)	20(30)
N(3)	170(40)	230(40)	210(40)	0(30)	0(30)	-10(30)
O(2)	120(30)	210(30)	200(30)	70(20)	-30(20)	80(30)
O(4)	200(30)	140(30)	90(30)	0(20)	20(20)	20(30)
N(1)	210(40)	70(30)	220(30)	10(30)	70(30)	-20(30)
N(2)	280(40)	210(40)	90(30)	-20(30)	10(30)	-20(30)
C(6)	90(40)	220(40)	300(50)	80(40)	20(40)	0(40)
C(2)	40(40)	200(40)	190(40)	0(30)	40(30)	-20(40)
N(4)	210(40)	110(30)	220(40)	-30(30)	20(30)	50(30)
C(10)	50(40)	200(40)	160(40)	10(30)	20(30)	120(40)
C(9)	180(40)	230(50)	160(40)	10(40)	120(40)	70(40)
C(4)	330(50)	180(40)	60(40)	0(30)	30(40)	-40(40)
C(3)	130(40)	90(40)	170(40)	-30(30)	80(30)	-40(30)
C(8)	170(50)	220(50)	200(40)	-170(40)	70(40)	-70(40)
C(5)	200(40)	60(40)	210(40)	-50(30)	60(40)	30(40)
C(7)	60(40)	140(40)	200(40)	-40(30)	-50(30)	-80(40)
C(1)	230(50)	260(40)	20(30)	-50(30)	50(30)	20(40)
O(6)	170(30)	180(30)	200(30)	-60(20)	60(20)	-60(30)
O(8)	250(30)	190(30)	150(30)	-50(20)	-40(20)	-20(30)
O(9)	150(30)	210(30)	100(30)	30(20)	10(20)	0(30)
O(7)	120(30)	340(30)	160(30)	-10(30)	30(20)	30(30)
N(5)	150(40)	50(30)	170(30)	10(30)	0(30)	40(30)
N(7)	160(40)	280(40)	200(30)	10(30)	50(30)	40(30)
N(6)	240(40)	230(40)	110(30)	10(30)	20(30)	-120(30)
C(19)	230(50)	290(50)	110(40)	-80(40)	-40(40)	-30(40)
N(8)	290(40)	220(40)	200(40)	20(30)	10(30)	-20(40)
C(16)	160(40)	110(40)	280(40)	-20(40)	0(40)	-40(40)
C(12)	150(40)	170(40)	150(40)	-10(30)	50(30)	50(40)
C(17)	90(40)	170(40)	100(40)	0(30)	20(30)	60(30)
C(20)	170(50)	240(50)	100(40)	50(30)	-40(30)	0(40)
C(15)	190(40)	210(40)	190(40)	40(40)	10(40)	-130(40)
C(14)	280(50)	70(40)	70(40)	-20(30)	-30(30)	100(40)
C(11)	170(40)	120(40)	90(40)	-90(30)	40(30)	70(40)
C(18)	250(50)	220(50)	250(50)	90(40)	-20(40)	40(40)
C(13)	130(40)	160(40)	170(40)	120(30)	-60(30)	60(40)

Table 5. Hydrogen coordinates ($\times 10^4$) and isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for jelena10.

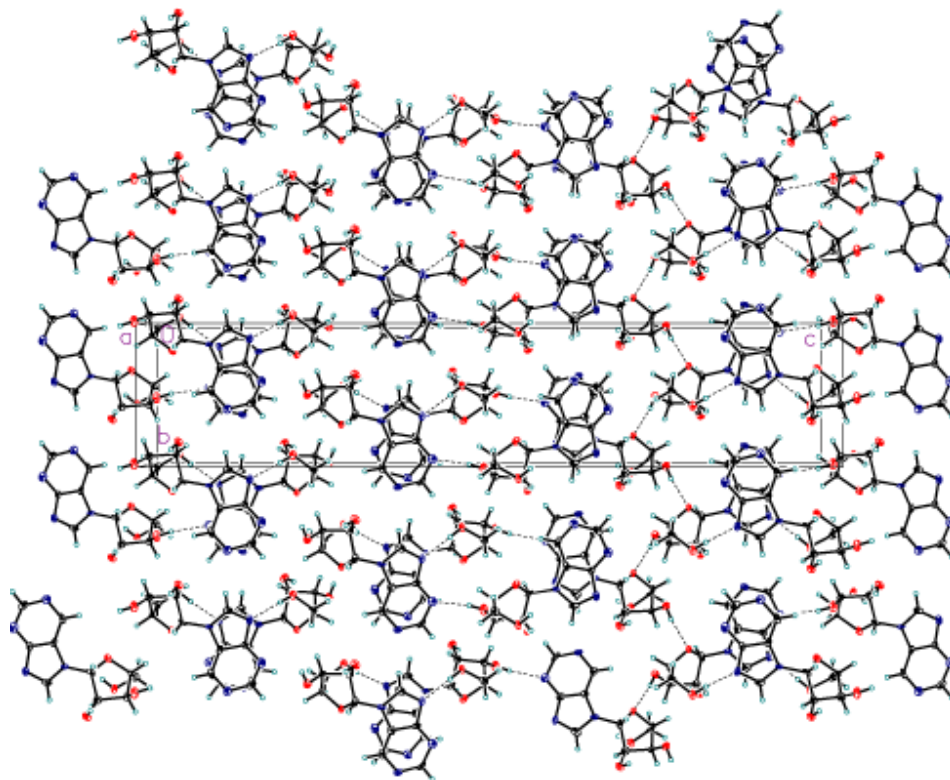
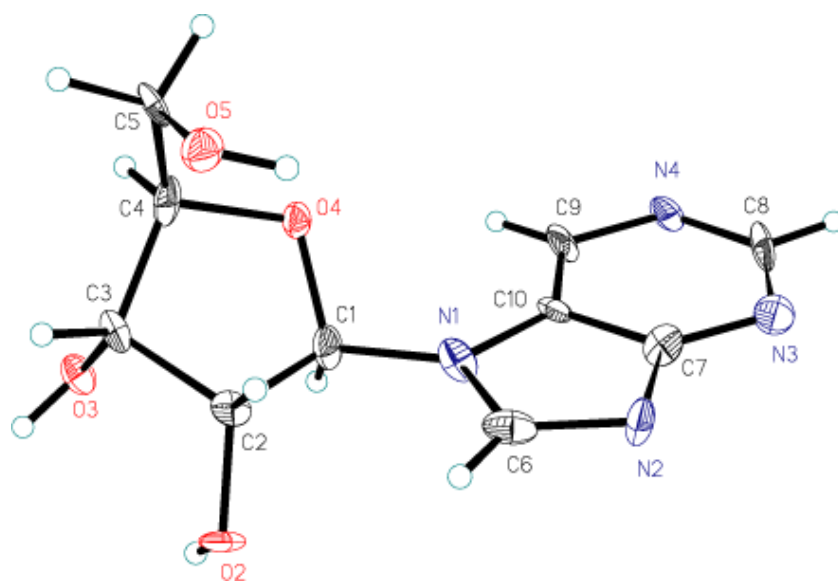
	x	y	z	U (eq)
H (5C)	4943	4813	3059	22
H (3B)	11121	4071	2365	27
H (2B)	11851	3911	2991	26
H (6A)	8635	4466	3700	24
H (2A)	8107	3883	3131	17
H (9A)	8984	10300	3225	23
H (4A)	7599	6509	2352	23
H (3A)	8274	3333	2528	15
H (8A)	7773	11997	4173	24
H (5A)	4441	6395	2591	19
H (5B)	4959	4732	2362	19
H (1A)	10517	6868	3014	20
H (6B)	249	3771	4520	27
H (9B)	7381	4999	4432	18
H (7A)	1792	5115	5294	31
H (19A)	2962	9931	4264	25
H (16A)	3573	4062	3825	22
H (12A)	4006	3588	4409	19
H (15A)	7732	6246	4945	24
H (15B)	7174	4452	5125	24
H (14A)	4599	6461	5143	17
H (11A)	1655	6584	4505	15
H (18A)	3780	11485	3295	29
H (13A)	3849	3223	5023	19

Table 6. Torsion angles [deg] for jelenal0.

C (7) -N (2) -C (6) -N (1)	1.2 (9)
C (10) -N (1) -C (6) -N (2)	-0.4 (9)
C (1) -N (1) -C (6) -N (2)	179.7 (7)
C (6) -N (1) -C (10) -C (9)	-179.6 (10)
C (1) -N (1) -C (10) -C (9)	0.3 (15)
C (6) -N (1) -C (10) -C (7)	-0.6 (8)
C (1) -N (1) -C (10) -C (7)	179.3 (7)
C (8) -N (4) -C (9) -C (10)	-0.3 (12)
C (7) -C (10) -C (9) -N (4)	0.1 (12)
N (1) -C (10) -C (9) -N (4)	178.9 (9)
C (1) -O (4) -C (4) -C (3)	-3.6 (7)
C (1) -O (4) -C (4) -C (5)	122.0 (7)
O (4) -C (4) -C (3) -O (3)	-87.3 (7)
C (5) -C (4) -C (3) -O (3)	150.6 (6)
O (4) -C (4) -C (3) -C (2)	27.8 (7)
C (5) -C (4) -C (3) -C (2)	-94.4 (7)
O (2) -C (2) -C (3) -O (3)	-47.2 (8)
C (1) -C (2) -C (3) -O (3)	75.6 (7)
O (2) -C (2) -C (3) -C (4)	-162.2 (6)
C (1) -C (2) -C (3) -C (4)	-39.3 (8)
C (9) -N (4) -C (8) -N (3)	2.1 (13)
C (7) -N (3) -C (8) -N (4)	-3.1 (12)
O (4) -C (4) -C (5) -O (5)	-68.6 (8)
C (3) -C (4) -C (5) -O (5)	50.8 (9)
C (8) -N (3) -C (7) -N (2)	-179.6 (8)
C (8) -N (3) -C (7) -C (10)	2.7 (11)

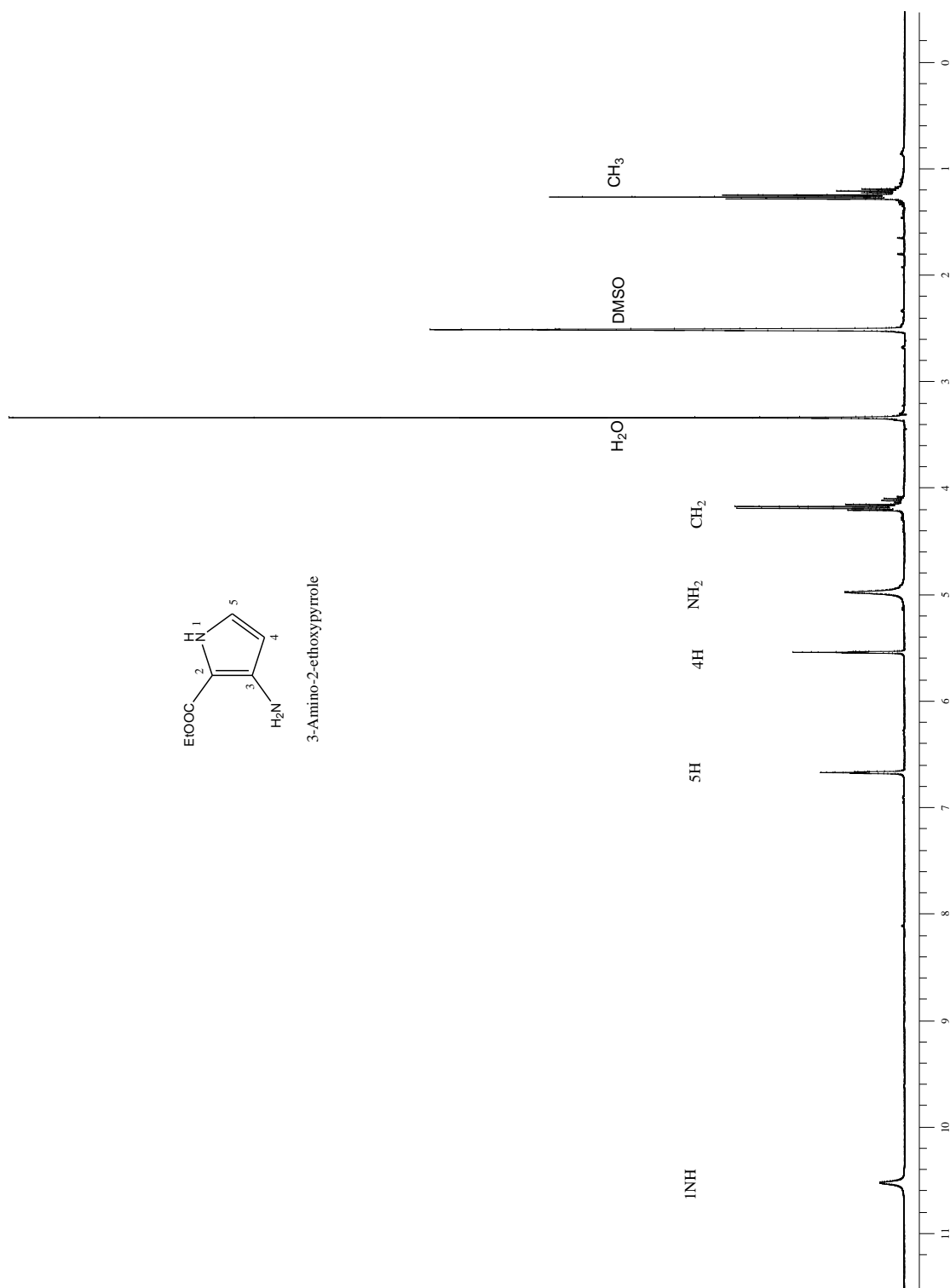
C(6)-N(2)-C(7)-N(3)	-179.6(7)
C(6)-N(2)-C(7)-C(10)	-1.6(9)
C(9)-C(10)-C(7)-N(3)	-1.4(12)
N(1)-C(10)-C(7)-N(3)	179.5(7)
C(9)-C(10)-C(7)-N(2)	-179.4(7)
N(1)-C(10)-C(7)-N(2)	1.4(9)
C(4)-O(4)-C(1)-N(1)	-143.7(6)
C(4)-O(4)-C(1)-C(2)	-21.6(8)
C(6)-N(1)-C(1)-O(4)	120.8(8)
C(10)-N(1)-C(1)-O(4)	-59.1(10)
C(6)-N(1)-C(1)-C(2)	4.6(12)
C(10)-N(1)-C(1)-C(2)	-175.3(7)
O(2)-C(2)-C(1)-O(4)	162.8(5)
C(3)-C(2)-C(1)-O(4)	37.5(7)
O(2)-C(2)-C(1)-N(1)	-78.8(9)
C(3)-C(2)-C(1)-N(1)	155.9(6)
C(20)-C(19)-N(8)-C(18)	0.0(12)
C(17)-N(6)-C(16)-N(5)	-0.9(9)
C(20)-N(5)-C(16)-N(6)	0.4(9)
C(11)-N(5)-C(16)-N(6)	-178.3(7)
C(18)-N(7)-C(17)-N(6)	-178.5(8)
C(18)-N(7)-C(17)-C(20)	0.7(11)
C(16)-N(6)-C(17)-N(7)	-179.7(8)
C(16)-N(6)-C(17)-C(20)	1.0(9)
N(8)-C(19)-C(20)-C(17)	1.5(13)
N(8)-C(19)-C(20)-N(5)	179.0(9)
N(7)-C(17)-C(20)-C(19)	-1.9(13)
N(6)-C(17)-C(20)-C(19)	177.4(8)
N(7)-C(17)-C(20)-N(5)	179.9(7)
N(6)-C(17)-C(20)-N(5)	-0.8(9)
C(16)-N(5)-C(20)-C(19)	-177.5(10)
C(11)-N(5)-C(20)-C(19)	1.3(15)
C(16)-N(5)-C(20)-C(17)	0.2(8)
C(11)-N(5)-C(20)-C(17)	179.0(7)
C(11)-O(8)-C(14)-C(13)	-3.4(7)
C(11)-O(8)-C(14)-C(15)	123.3(6)
O(9)-C(15)-C(14)-O(8)	-56.8(8)
O(9)-C(15)-C(14)-C(13)	63.5(9)
C(14)-O(8)-C(11)-N(5)	-146.4(6)
C(14)-O(8)-C(11)-C(12)	-23.6(7)
C(16)-N(5)-C(11)-O(8)	117.2(8)
C(20)-N(5)-C(11)-O(8)	-61.2(9)
C(16)-N(5)-C(11)-C(12)	-1.3(12)
C(20)-N(5)-C(11)-C(12)	-179.8(7)
O(6)-C(12)-C(11)-O(8)	164.6(6)
C(13)-C(12)-C(11)-O(8)	39.7(7)
O(6)-C(12)-C(11)-N(5)	-76.7(9)
C(13)-C(12)-C(11)-N(5)	158.4(6)
C(17)-N(7)-C(18)-N(8)	1.0(13)
C(19)-N(8)-C(18)-N(7)	-1.4(14)
O(8)-C(14)-C(13)-O(7)	-85.3(7)
C(15)-C(14)-C(13)-O(7)	153.0(6)
O(8)-C(14)-C(13)-C(12)	27.9(7)
C(15)-C(14)-C(13)-C(12)	-93.8(7)
O(6)-C(12)-C(13)-O(7)	-46.2(8)
C(11)-C(12)-C(13)-O(7)	78.2(7)
O(6)-C(12)-C(13)-C(14)	-164.0(6)
C(11)-C(12)-C(13)-C(14)	-39.7(7)

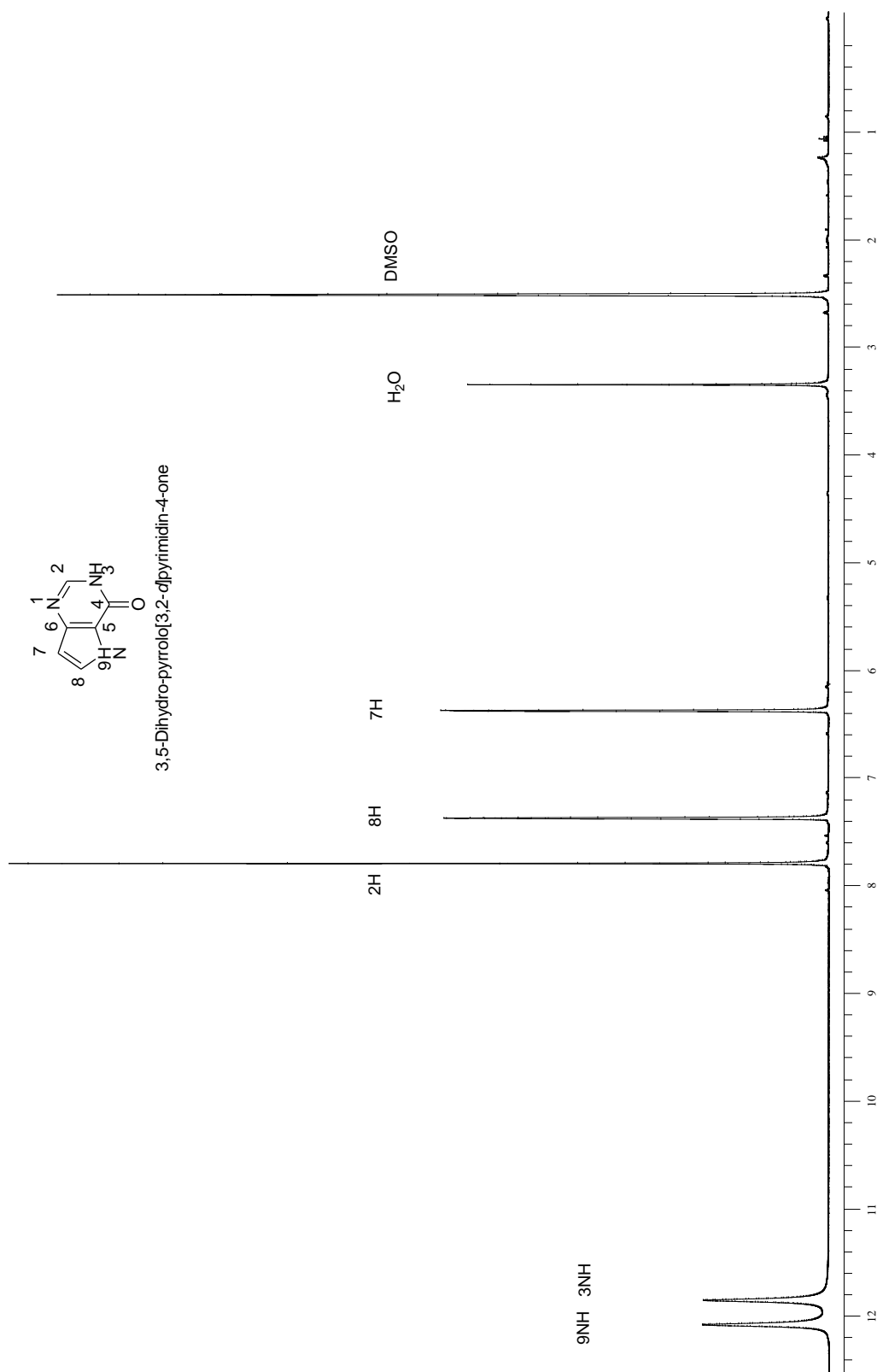
Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

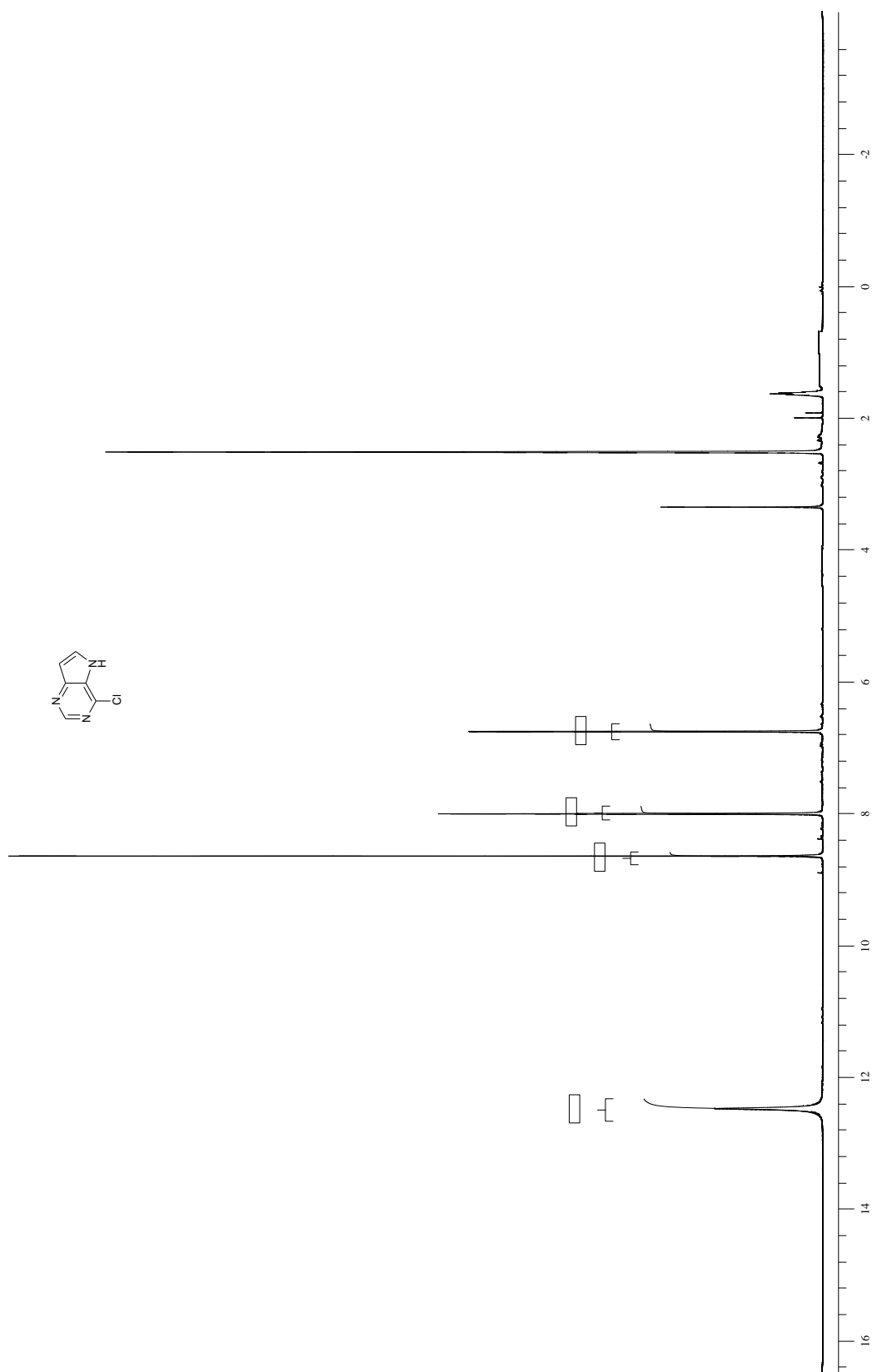


Teil B Ausgewählte Spektren

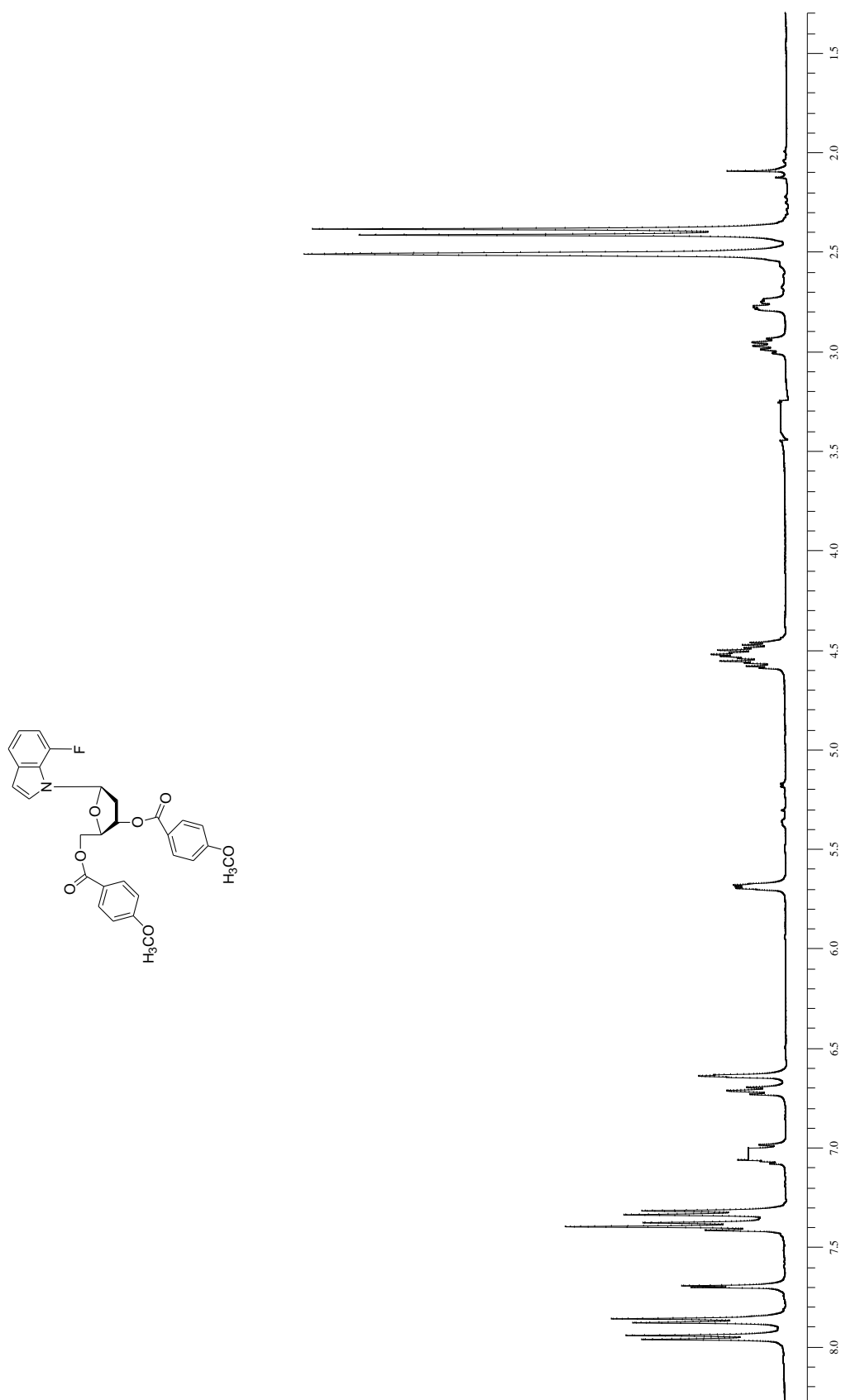
- B1** ^1H -NMR Spektrum von 3-Amino-2-ethoxycarbonylpyrrol 30
- B2** ^1H -NMR Spektrum von 3*H*,5*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on 31
- B3** ^1H -NMR Spektrum von 6-Chloro-9-deaza-purin 32
- B4** ^1H -NMR Spektrum von 1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-7-fluorindol 38
- B5** ^1H MBC-NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(7-*N*-purin)- β -D-ribofuranose 48
- B6** ^1H -NMR Spektrum von 4,6-Difluorindol-2-carbonsäure 109
- B7** COSY-NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose 49
- B8** ^1H -NMR Spektrum von 1-(2'-desoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol 38

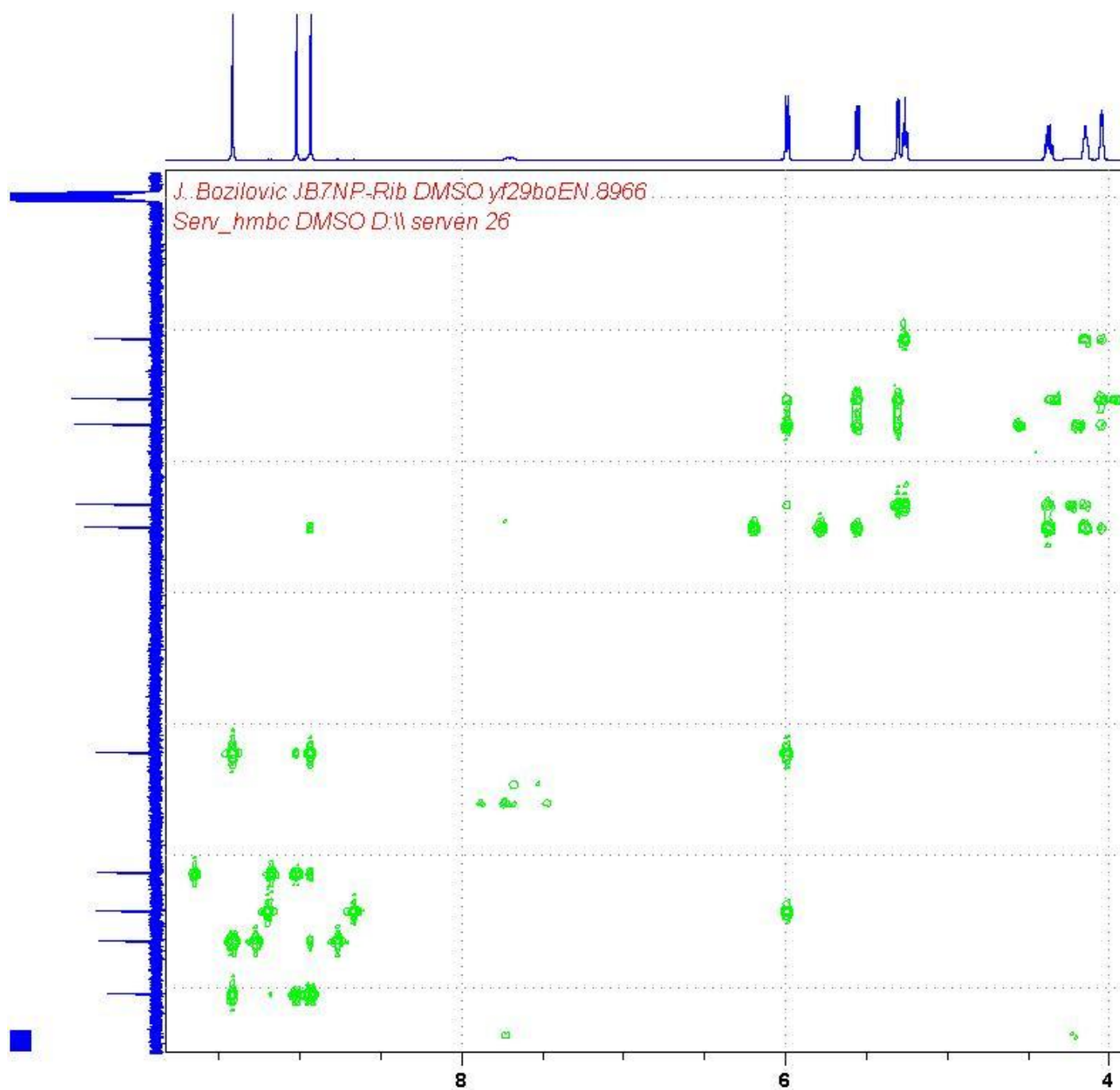
B1 ^1H -NMR Spektrum von 3-Amino-2-ethoxycarbonylpyrrol 30

B2 ^1H -NMR Spektrum von 3*H*,5*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-on **31**

B3 ^1H -NMR Spektrum von 6-Chloro-9-deaza-purin **32**

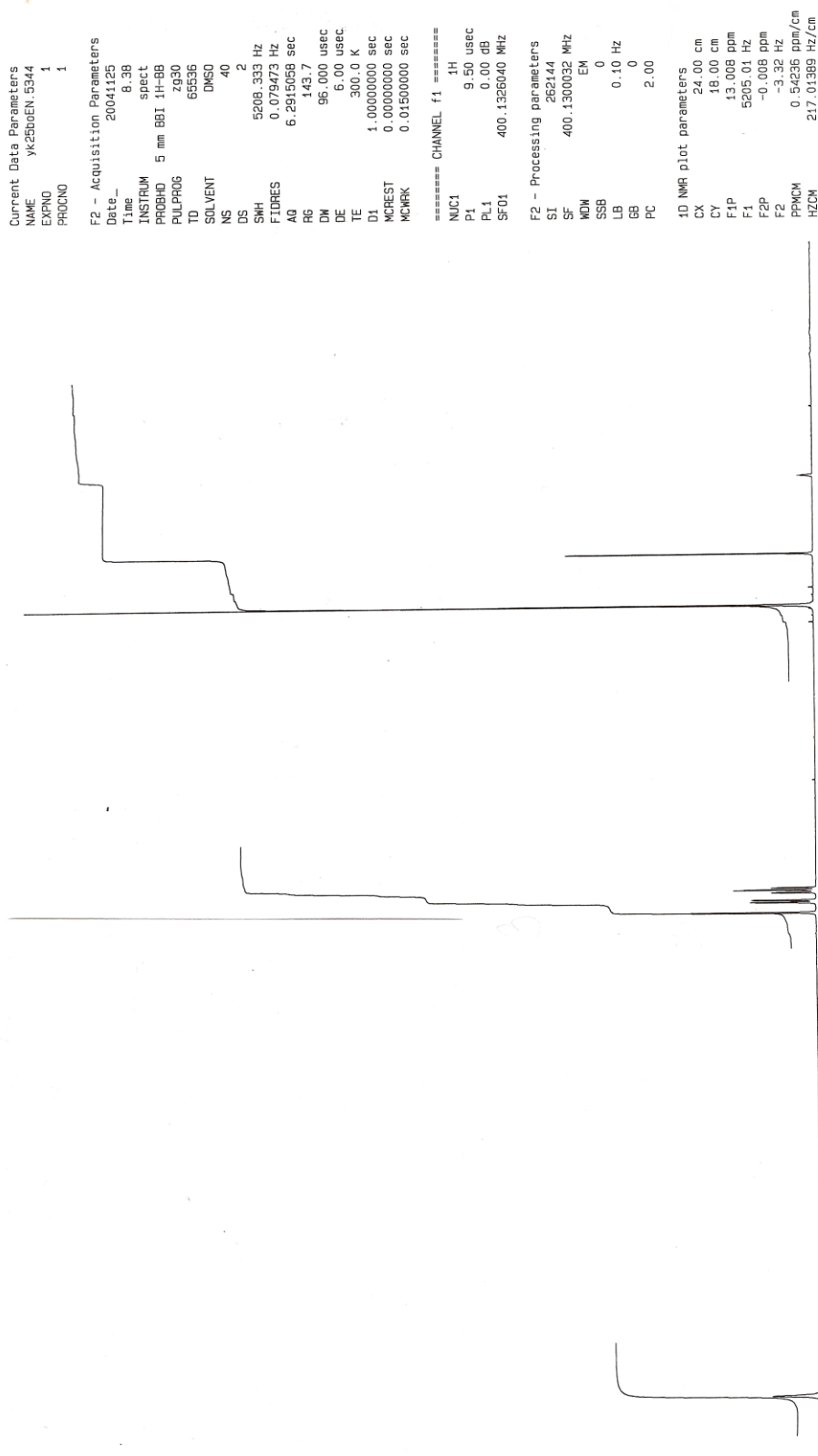
B4 ^1H -NMR Spektrum von 1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-7-fluorindol **38**



B5 ^1H MBC-NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(7-N-purin)- β -D-ribofuranose48

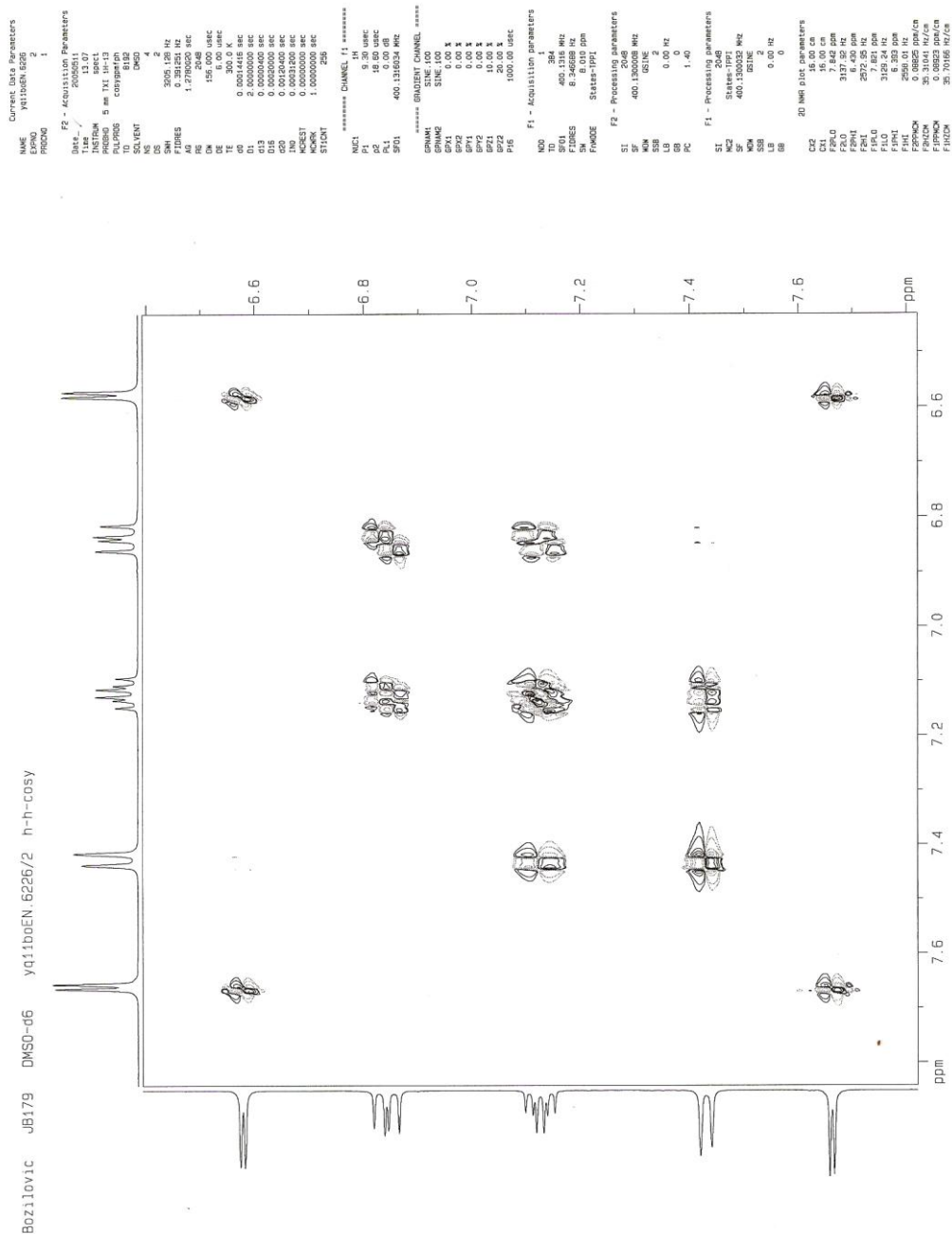
B6 ¹H-NMR Spektrum von 4,6-Difluorindol-2-carbonsäure 109

Bozilovic JB110b DMSO-d6 yk25boEN.5344



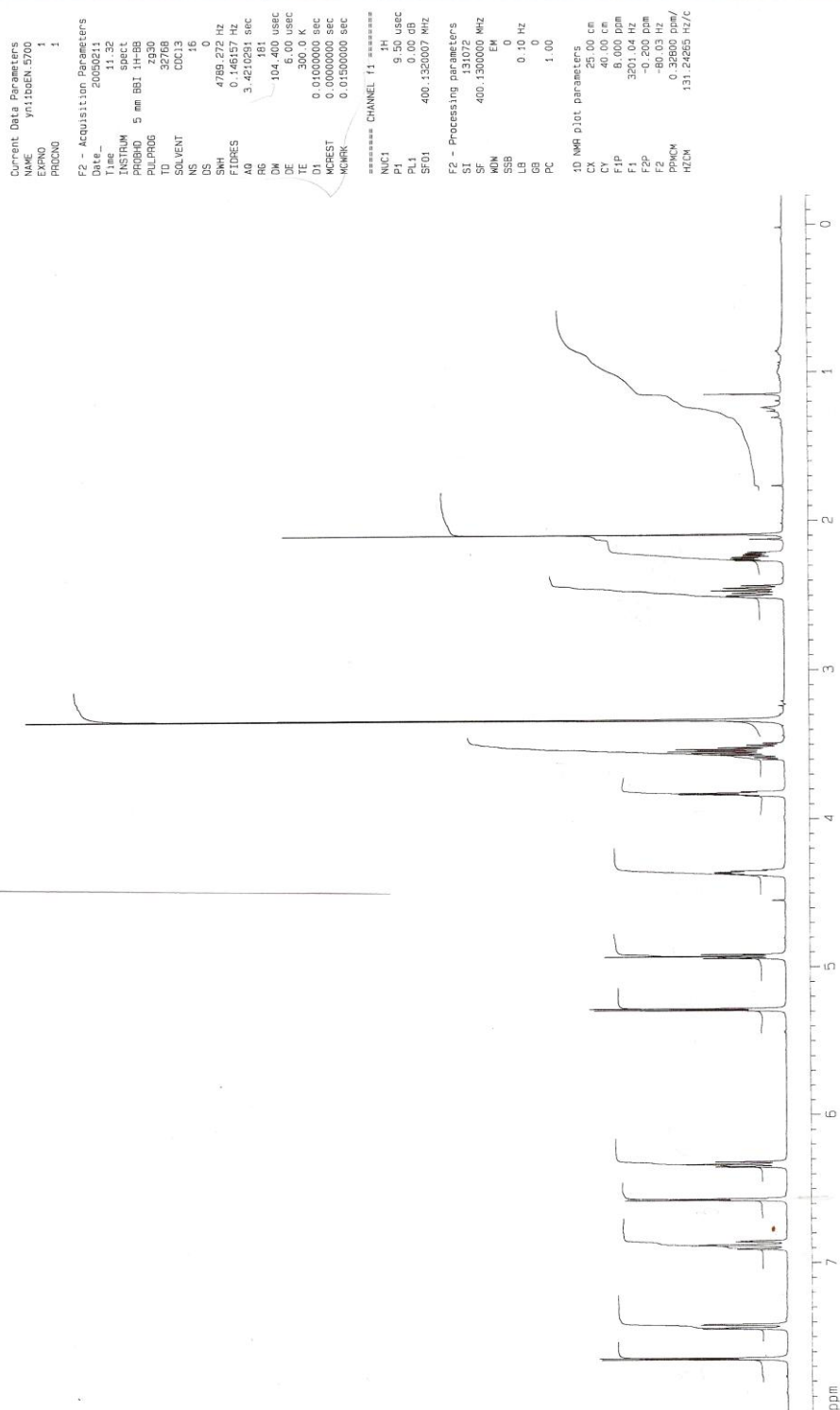
B7 COSY-NMR Spektrum von 1'-Desoxy-1'-(4-fluorindolyl)- β -D-ribofuranose

49



B8 ^1H -NMR Spektrum von 1-(2'-desoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-4,6-difluorindol **38**

J. Bozillovic JB136 DMSO yn1boen.5700 1 ^1H



Teil C Abkürzungsverzeichnis**A**

a	Akzeptor
α	Bruchteil der Oligonukleotide im geordneten Zustand
Å	Ångström
Abk.	Abkürzung
abs.	absolut
Ac	Acetyl
ar	aromatisch
a_w	Wasseraktivität

B

b_o	Ordinatenschnittpunkt der oberen Basislinie von Oligonucleotid Schmelzkurven
b_u	Ordinatenschnittpunkt der unteren Basislinie von Oligonucleotid Schmelzkurven
Bn	Benzyl
br	breit
BSA	Bis-(trimethylilyl)-acetamid
Bu	Butyl
Bz	Benzoyl

C

C	Celsius
C	Cytosin, Cytidin
c	Konzentration
ca.	circa
CD	Circular Dichroismus
COSY	korrelierte Spektroskopie (engl.: correlated spectroscopy)
CPG	controlled pore glass (engl.)
CSD	Cambridge Structural Database
c_t	totale Strangkonzentration

D

δ	Chemische Verschiebung
d	Dichte
d	Dublett
d	Schichtdicke
d	Netzebenenabstand
d	Donor
D	Dimensional
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett von Dublett
ddA	Didesoxyadenosin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ΔG^0	Freie Standardreaktionsenthalpie
ΔH^0	Standardreaktionsenthalpie
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- d_6	Dimethylsulfoxid sechsfach deuteriert
DMTr	Dimethoxytriphenylmethyl, Dimethoxytrityl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ΔS^0	Reaktionsentropie
dt	Dublett von Triplett
Du	Duplex

E

ϵ	Extinktion (engl.: absorbance)
E	envelope
El.	Elementar
engl.	englisch
eq.	Equivalente
ESI(-)	Elektrospray-Ionisation im negativen Modus
ESI(+)	Elektrospray-Ionisation im positiven Modus
Et	Ethyl

F

f	Funktion
2FA	2-Fluoradenosin
FC	Flash-Chromatographie
FT	Fourier Transformation

G

G	Guanin, Guanosin
Γ	Hydratation
g	gasförmig
g	Gramm
ges.	gesättigt(e)

H

h	Stunde(n)
HIV	Human immunodeficiency virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl.: high performance liquid chromatography)
Hz	Hertz

I

iPr	Isopropyl
IR	Infrarot

J

J	Kupplungskonstante in der NMR-Spectroscopie
---	---

K

K	Gleichgewichtskonstante
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
katal.	katalytisch
kcal	Kilokalorien

K_{Diss}	Dissoziationskonstante
konz.	konzentriert
krist.	kristallin

L

λ	Wellenlänge
λ_{max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
LDA	Lithiumdiisopropylamin
log P	Verteilungskoeffizient
Lsg.	Lösung

M

M	molar
m	Masse
m	Multiplett
m_o	Steigung der oberen Basislinie von Oligonukleotid Schmelzkurven
m_u	Steigung der unteren Basislinie von Oligonukleotid Schmelzkurven
MALDI	Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation (engl.: matrix assisted laser desorption/ionization)
max.	maximal
Me	Methyl
mg	Milligramm
mGrad	Milligrad
MHz	Megahertz
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
μM	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MMTr	Monomethoxytriphenylmethyl, Monomethoxytrityl
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
μV	Mikrovolt

N

nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl.: Nuclear Magnetic Resonance)
NPE	Nitrophenylethyl
Nr.	Nummer

O

o	ortho
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm, Extinktion bei 260 nm
OD _o	Optische Dichte (Extinktion) der oberen Basislinie von Oligonukleotid Schmelzkurven
OD _u	Optische Dichte (Extinktion) der unteren Basislinie von Oligonukleotid Schmelzkurven
ODN	Oligodesoxynukleotid

P

ψt	Pseudotriplett
p	para
p.a.	pro analysi
pDC	präparative Dünnschichtchromatographie
pm	picometer
ppm	parts per million

Q

q	Quartett
---	----------

R

R	universelle Gaskonstante
r	Radius
r	ribo
r ²	Gütefaktor der linearen Regression
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure

ROE	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (engl.)
RP	Umkehrphase (engl.: reversed phase)
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur

S

s	Singulett
s	Sekunde(n)
S	Strang
Sdp.	Siedepunkt

T

Θ	Elliptizität
$[\Theta]_{\lambda}$	spezifische Elliptizität
$[\Theta_M]_{\lambda}$	molare Elliptizität
T	Thymin, Thymidin
T	Temperatur
t	Triplett
TBDMS	<i>tert.</i> Butyldimethylsilyl
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TEA	Triethylamin
techn.	technisch
tert.	tertiär
Tf	Trifluormethylsulfonat, Triflat
THF	Tetrahydrofuran
T_m	Schmelztemperatur (engl.: melting temperature)
TMS	Trimethylsilyl
TMSTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat, Trimethylsilyltriflat
Tr	Triphenylmethyl, Trityl
tRNA	transfer Ribonucleinsäure

U

U Uracil, Uridin

UV Ultraviolett

V

V Volumen

VIS sichtbar (engl.: visible)

W

wäßr. wäßrig

Z

z Ladung

Publikationen und Poster

a. Publikationen

- [1] **Božilović, J.**, Nikolaus N., Engels J.W., "Microwave-assisted Vorbrüggen Ribosylation reaction" *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2007**, 26, 889-892
- [2] **Božilović, J.**, Engels J.W. "Synthesis of Fluorinated Indoles as RNA Analogues" *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2007**, 26, 869-871
- [3] **Božilović, J.**, Bats J. W., and Engels J. W. "Synthesis and Structure of Fluoroindole Nucleosides" *Can. J. Chem*, **2007**, 85 (4), 283-292
- [4] **Božilović, J.**, Bats J. W., Engels, J. W., „Synthesis and Crystal Structures of Fluorinated Indoles as RNA Analogues" *Collection Symposium Series* **2005**, 7, 385-386
- [5] **J. Božilović**, J. W. Bats, A. N. Koller, H. Gohlke, "Fluorinated Indoles, 7-*N*- and 9-Deaza-Purine as RNA Base Analogues" *in preparation*

b. Poster

- [1] **Božilović, J.**, Koller A., Gohlke H, Engels J. W. „Synthesis and Properties of Fluoroindoles, and 7-*N*-purine as RNA Substitutes" International Symposium "RNA-Ligand-Interactions" 27-29.09.2007, Frankfurt am Main

[2] **Božilović, J.**, Bats J. W., Koller A., Gohlke H, Engels J. W. „Synthesis and Properties of Fluoroindoles, and 7-*N*-purine as RNA Substitutes“ 2nd Sciences European Conference on Chemistry for life, 04.-08.2007, Wrocław, Poland

[3] **Božilović, J.**, Koller, A., Gohlke, H., Engels, J. W., “The Influence of Fluoroindoles, Fluorobenzimidazoles and 7-*N*-Purine on Base Pairing in RNA Oligonucleotides” International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 03.-07.2006, Bern Switzerland

[4] **Božilović, J.**, Bats J. W., Engels, “Fluorinated Indoles as Novel RNA Analogues“ First European Conference on Chemistry for life Sciences, 04.-08.2005, Rimini, Italy

[5] **Božilović, J.**, Bats J. W., Engels, “Synthesis and Crystal Structures of Fluorinated Indoles as RNA Analogues” XIII Symposium on the Chemistry of Nucleic Acid Components, 03-08.09.2005, Spindleruv Mlýn, Tschechische Republik.

Curriculum vitae

Jelena Božilović

20. Juli 1972 in Niš, Serbien

Schule

1979 – 1987	Grundschule in Grdelica, Serbien
1987 – 1991	Medizinische Schule, Abteil Pharmazie in Leskovac
12.06.1991	Abitur

Studium

1993-1998	Chemiestudium, Universität in Niš
10.11.1998	Diplom, Note 10 (ausgezeichnet) Thema der Diplomarbeit: „Intermolekulare Umlagerungen in Bicyklische Kohlenhydrate“

Arbeitserfahrung

01.12.1998-31.10.2003	Tätigkeit in der Apotheke, als PTA
Seit Jan.2004	Anfertigung der Dissertation am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J.W. Engels

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, 03.04. 2008

Jelena Božilović